

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



**Vliv stresu na rychlost učení u hlodavců – etologický a
fyziologický přístup**

Bakalářská práce



Jitka Havlová

Vedoucí práce: Mgr. Michala Zelenková

České Budějovice 2009

Havlová J. (2008): Vliv stresu na rychlost učení u hlodavců – etologický a fyziologický přístup. [Stress impact on learning in rodents – ethological & physiological approach. Bc. Thesis, in Czech.] – p. 30, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The review compares two methodological approaches of studying stress impact on learning in rodents. Particular forms of stress that can harm or facilitate memory and learning process are distinguished. Permanent exposure to hormone treatments results in space memory damage, whereas short-term exposure enforces the learning processes. Ethological methods have predominantly a negative effect on learning, particularly on space learning and reference memory. On the contrary, some methods can facilitate learning process. Variable outputs are received when applying short-term and long-term stress.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 12. 1. 2009

.....
Jitka Havlová

Poděkování:

Především bych ráda poděkovala své školitelce za její trpělivé vedení, pomoc a poskytnutí dobrých rad. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu při studiu a svým spolubydlícím za toleranci a motivaci.

OBSAH:

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 2 |
| 1.1. Úvod..... | 2 |
| 1.2. Stres..... | 2 |
| 1.2.1. Stresové hormony..... | 2 |
| 1.2.2. Stres a paměť..... | 3 |
| 1.3. Učení..... | 3 |
| 1.3.1. Klasické podmiňování..... | 3 |
| 1.3.2. Operantní učení..... | 4 |
| 1.3.3. Prostorové učení..... | 4 |
| 1.3.4. Paměť..... | 5 |
| 2. Druhy přístupu | 6 |
| 2.1. Fyziologický přístup..... | 6 |
| 2.1.1. Aplikace stresového hormonu..... | 6 |
| 2.1.2. Narušení HPA osy..... | 7 |
| 2.2. Etologický přístup..... | 8 |
| 2.2.1. Spánková deprivace..... | 8 |
| 2.2.2. Nedostatek potravy..... | 9 |
| 2.2.3. Stres omezením..... | 10 |
| 2.2.4. Prenatální stres..... | 11 |
| 2.2.5. Stres z predátora..... | 12 |
| 2.2.6. Sociální stres..... | 14 |
| 2.2.7. Elektrošoky..... | 15 |
| 2.2.8. Další etologické metody..... | 16 |
| 3. Diskuse | 18 |
| 3.1. Fyziologický přístup..... | 18 |
| 3.2. Etologický přístup..... | 18 |
| 3.3. Optimální hladina stresu..... | 20 |
| 4. Závěr | 22 |
| 5. Literatura | 23 |

1. Úvod

1.1. Úvod

V současné době se hodně diskutuje o působení stresu a stresových hormonů na organismus zvířat a také o jeho vlivu na učení a paměť. Stres je velice důležitým faktorem ovlivňujícím živočišné druhy. Jeho negativní vliv způsobuje nezanedbatelné zdravotní problémy (fyzické i duševní), vážné nemoci a v krajním případě může chronický stres končit až smrtí organismu. Stres však negativně ovlivňuje i schopnost učení (Shors, 2004). Jeho dlouhodobé působení narušuje funkce paměti a činnost mozku vůbec (Sherwood et al., 2005). Schopnost učit se a pamatovat si je pro život velice důležitá. Tyto funkce například zajišťují schopnost vyvíjet se, správně reagovat na vnější podněty, vyhnout se nebezpečným situacím na základě zkušeností a celkově umožňují překonat predační i selektivní tlak.

1.2. Stres

Stres je obecná nespecifická odpověď na určitý faktor, který ohrožuje nebo by mohl ohrozit schopnosti organismu udržovat homeostázi (Bowman, 2005). Činitel způsobující tuto odpověď se nazývá stresor. Dlouhodobé vystavení chronickému stresu, může vést k vyčerpání, myopatii, hypertenzi, imunosupresi, neplodnosti, gastrointestinálním poruchám a dokonce i k smrti živočicha (Bowman, 2005).

1.2.1. Stresové hormony

Z kůry nadledvinek jsou vylučovány steroidní hormony – glukokortikoidy (Sherwood et al., 2005). K hlavním stresovým hormonům patří kortisol a kortikosteron (Palme et al., 2005). Tyto dva hormony pomáhají živočichům vyrovnávat se se stresem, obzvláště se stresem dlouhodobým (Sherwood et al., 2005).

Reakcí na možné druhy stresových situací je zvýšení sekrece glukokortikoidů, která je zprostředkována centrálním nervovým systémem. Z tohoto důvodu je měření hladiny stresových hormonů pomocí krevních vzorků živočichů nejlepším indikátorem stresu (Sherwood et al., 2005; Fletcher et Boonstra, 2006). Dále můžeme hladinu stresových hormonů zjistit analýzou výměšků (Harper et Austad, 2000; Keay et al., 2006).

Sekrece glukokortikoidů z kůry nadledvin je regulována osou hypothalamus-hypofýza-

nadledviny. Tuto sekreci stimuluje adrenokortikotropní hormon (ACTH) z předního laloku hypofýzy. Když tedy stresor z vnějšího prostředí aktivuje nervový systém, hypothalamus vyloučí kortikotropin-uvolňující hormon (CRF), který stimulací předního laloku hypofýzy uvolní ACTH. Uvolněný ACTH poté stimuluje sekreci kortikosteronu (Bowman, 2005).

1.2.2. Stres a paměť

Při stresu je produkována řada stresových hormonů (kortikosteron, kortisol), které nepříznivě ovlivňují funkce hippocampu a ve větším množství mají za následek degeneraci neuronů (McEwen et Sapolsky, 1995). Tyto hormony pak ovlivňují i nervové funkce jakou je třeba paměť. Například dlouhodobé zvýšení hladiny kortisolu kvůli stresu u lidí a laboratorních savců způsobuje ztrátu paměti (Sherwood et al., 2005). Avšak krátkodobé působení stresu může mít na učení i příznivé účinky. Například Luine et al. (1996) zjistili, že u mladých samců potkanů krátké periody imobilizačního stresu výkonnost prostorového učení zvýšily.

McEwen et Sapolsky (1995) uvádějí, že zatím nebyla publikována žádná práce, která by se zabývala stanovením přesné hladiny glukokortikoidů, která by mohla ovlivňovat učení.

1.3. Učení

Učení je způsob získávání informací o okolním prostředí, jeho změnách a vnímání dalších důležitých poznatků, které přispívají k rozvoji a přežití organismu. Také může být definováno jako změna chování na základě předchozí zkušenosti a následné postupné vytváření paměťové stopy opakováním podnětů. U hlodavců jsou studovány 3 druhy učení – klasické podmiňování, operantní a prostorové učení.

1.3.1. Klasické podmiňování

Klasické podmiňování je typ asociačního učení. Je pro ně typické převedení obyčejného (tzv. nepodmíněného) podnětu ve spojení s cílem obdržet odměnu do složitější formy chování, do podnětu podmíněného (Veselovský, 2005). Objev podmíněného chování je dílem ruského fyziologa I. P. Pavlova, který položil základy asociačního učení. Podmíněná reakce nastane působením podmíněného podnětu, který u živočicha vyvolá podmíněný reflex. Principem podmiňování je vytvořit spojení mezi získáním stejné odměny u podmíněného i nepodmíněného podnětu (Veselovský, 2005).

V současné době se při zkoumání klasického podmiňování využívají různé metody.

Jednou z nich je například podmíněné mrkání, kdy jako nepodmíněný podnět působí hlukový stimul, podmíněným je periorbitální šok do očního víčka způsobující mrknutí. Cílem je naučit daného jedince mrknout při zaznění hlukového stimulu (Shors et al., 2000).

1.3.2. Operantní učení

Operantní nebo-li instrumentální podmiňování spočívá v učení pokusem a omylem, snahou docílit úspěchu nebo se vyhnout nepříjemnému podnětu. Je to typ asociačního učení, kdy se odměnou stává určitý pohyb směřující k nějakému cíli (Veselovský, 2005). Existují 2 hlavní metody zkoumání tohoto učení – avoidance a Skinnerův box.

Skinnerův box je klec či box, ve kterém je na boční straně umístěna páčka. Vynálezcem tohoto boxu byl psycholog Skinner a svůj výzkum prováděl na holubech. Úkolem testovaných ptáků byl získat potravu, tím že klovali do destiček (Veselovský, 2005). V současné době se Skinnerův box používá pro testování diskriminačního učení. Pokusné zvíře musí pro získání odměny po nějakém stimulu stlačit pedál, například po zaznění zvukového signálu (Sakai et al., 1999).

Avoidance je reakce vyhnutí. Jedinec se snaží vyhnout se určité oblasti, aby na něj nebyl aplikován nepříjemný podnět nebo se učí vyvinout určitou činnost, díky které by se mohl nepříjemnému podnětu vyhnout. Nepříjemným podnětem v pokusech bývá například elektrický proud v kovové podlážce (Klenerová et al., 2002; Brennan, 2004). Příkladem avoidance je takzvaný únikový test (Mauderli et al., 2000), při kterém se využívá teplotní stimulace. Teplotní stimul je vyslán z podlahy do končetin volně se pohybujícího zvířete. Cílem je naučit se uniknout před stimulem z jedné části boxu do jiné.

1.3.3. Prostorové učení

Prostorové učení je zvláštní forma operantního učení. Tato forma učení je důležitá především z hlediska schopnosti orientace v prostoru nebo nalezení vhodné únikové cesty. Například správná orientace v prostoru zvířeti umožňuje znovu nalézt ukryté zásoby či důležitý zdroj potravy. Naučení únikové cesty zase může zvířeti pomoci při úniku před predátorem či v nějaké životu nebezpečné situaci.

Úlohy, které se tímto druhem učení zabývají, jsou zaměřeny buď na preferenci místa (pozitivní motivaci) nebo na vyhýbání se místu (negativní motivaci). Ke zkoumání prostorového učení se používají různé typy bludišť. Jsou to například bludiště ve tvaru písmene T (Gerlai, 1998) a Y, radiální mnoho-ramenná bludiště, vyvýšené bludiště ve tvaru

znaménka plus či Morrisovo vodního bludiště (MVB). Bludiště mohou být využita při testování jak pracovní tak i referenční paměti (Coburn-Litvak et al., 2003).

Typickou technikou pro testování prostorové paměti je Morrisovo vodní bludiště (Morris, 1981). Potkan v něm má za úkol nalézt ostrůvek skrytý pod hladinou. Zvíře ostrůvek nevidí, jeho polohu si musí zapamatovat pouze podle vztahů k okolnímu prostředí. Po několika pokusech by mělo být schopno najít cíl z jakéhokoliv místa bazénu přímou cestou. Tento pokus může být modifikován změnou umístění plošinky či jejím vyjmutím.

Dalším druhem používaného bludiště je radiálního bludiště (Lipp et al., 2001). Nejčastěji se pokusy provádějí v jeho 8-ramenné formě. Zkoumané zvíře je umístěno doprostřed bludiště a jeho cílem je sbírat potravu nacházející se na konci ramen. Modifikací může být například zablokování některých ramen bludiště. Za důsledky poškození prostorové paměti jsou považovány dvojité vstupy do ramen. V tomto typu bludiště jsou testovány různé druhy zvířat (potkani, králíci, ježci, ptáci).

V současné době většina studií zabývajících se prostorovou pamětí a učením využívá při výzkumu především techniku MVB.

1.3.4. Paměť

Paměť zaznamenává, rozděluje a také ukládá získané informace a vjemy. Je velice důležitá pro život, protože bez ní by bylo nemožné využívat našich získaných poznatků a dovedností. Začátkem procesu zapamatování si je paměť krátkodobá, nebo-li pracovní. Tato paměť má sice malou kapacitu, ale je schopna rychlého vybavení si informace. Druhou fází je uložení informace, opakováním a cvičením, z krátkodobé paměti do dlouhodobé. Dlouhodobá paměť terciární je posledním místem zapamatování, kde jsou umístěny základní dovednosti a informace, které jsou ve své podstatě nezapomenutelné (Veselovský, 2005).

Zapamatování si je u primární a terciární paměti rychlé, u sekundární pomalé. Krátkodobá paměť může být lehce narušena například elektrickým šokem či otřesem mozku (Veselovský, 2005).

2. Druhy přístupu

2.1. Fyziologický přístup

Fyziologický přístup spočívá ve vytvoření uměle navozeného stresu. Ten je způsoben použitím různých fyziologických postupů. Tyto postupy zahrnují přímou aplikaci stresových hormonů do těla zvířete (injekcí, vodou) či poranění části osy hypothalamus-hypofýza-nadledvinky (HPA). Tato osa kontroluje sekreci a funkce stresových hormonů (Bowman, 2005). Účinky stresu na učení jsou pak určeny na základě experimentálních pokusů zkoumajících různé druhy učení.

K pokusům se používají různé kmeny potkanů (Sprague-Dawley, Wistar, Fischer-344, Long-Evans).

2.1.1. Aplikace stresového hormonu

Při aktivaci HPA osy stresem dojde k sekreci glukokortikoidů z kůry nadledvinek (Bowman, 2005). Tyto stresové hormony (kortikosteron, kortisol) udržují nebo obnovují homeostázi pomocí mobilizace energie. Mohou také tlumit funkce mozku a učení.

Vlivem kortikosteronu na prostorové učení se zabývali například Coburn-Litvak et al. (2003). Sprague-Dawley potkanům podávali 21 dní nebo 56 dní injekce kortikosteronu. Testování prostorového učení pak proběhlo 24 hodin po poslední dávce hormonu. Pro test byly zvoleny 2 typy bludiště (Y-bludiště, Barnesovo bludiště). Z výsledků vyplývá, že na prostorové učení v Y-bludišti mělo negativní vliv jen delší dávkování. U Barnesova bludiště pak došlo k poškození paměti referenční namísto pracovní.

Hebda-Bauer et al. (1999) také zkoumali působení kortikosteronu na prostorové učení. Pokusnými zvířaty byli potkani Fischer-344 ve 3 věkových kategoriích. Zvířata byla nejdříve testována v MVB, poté jim byl 15 dní podáván hormon. Poslední den aplikace kortikosteronu byli potkani znovu umístěni do bludiště. Ukázalo se, že vysoká hladina kortikosteronu učení u zvířat nepoškodila. Nejstarší jedinci dokonce projevili zlepšení stářím poškozeného prostorového učení.

Hui et al. (2004) testovali vliv okamžitého post-tréninkového podání kortikosteronu na klasické podmiňování u Sprague-Dawley potkanů. Klasické podmiňování spočívalo v obdržení sluchového stimulu, který byl následován elektrickým šokem. Hned poté byly zvířatům aplikovány injekce kortikosteronu (1.0 nebo 3.0 mg/kg), další skupině byla injekce

podána až za 3 hodiny. Zjistili, že kortikosteron podaný po 3 hodinách od tréninku proces vybavení si neovlivnil, zatímco injekce aplikovaná okamžitě tento proces prodloužila. To se projevilo na horších reakcích následujícího dne. Sandi et al. (1997) naopak zjistili, že okamžité podání stresového hormonu po tréninku v MVB dlouhodobou konsolidaci učení zlepšilo.

Akirav et al. (2004) zkoumali, zda různá hladina kortikosteronu ovlivní prostorové učení. Zvířatům byly podány 2 dávky kortikosteronu (10 a 25 mg/kg). Poté byla testována na prostorové učení v MVB ve studené a teplé vodě. Ze studie vyplývá, že zvířata trénovaná ve studené vodě si vedla lépe než ta ve vodě teplé. Potkani s nízkou dávkou kortikosteronu dosáhli v teplé vodě lepších výsledků než ti s dávkou vyšší, jak v akvizici tak i ve vybavení paměti. Souhrnně vzato, zvýšená hladina kortikosteronu zlepšila výkon, zatímco blokování hormonu pomocí metyraponu učení poškodilo.

McLay et al. (1998) provedli svůj pokus testování vlivu glukokortikoidů na učení na potkanech kmene Fisher-344. Zvířatům byla pod kůži aplikována tableta obsahující kortikosteron (150 mg). Kortikosteron byl z tablety uvolňován rovnoměrným způsobem po dobu 81 dní. Poté byli potkani testováni v Barnesově bludišti. Výsledným efektem bylo poškození prostorového učení.

2.1.2. Narušení HPA osy

Funkce hippocampu jsou důležité pro akvizici, konsolidaci a vybavení si prostorové paměti (Roosendaal, 2003). Vysoké koncentrace glukokortikoidů (GCs) mají na akvizici i vybavení paměti negativní vliv (Sousa et al., 2000; Kim et al., 2001). Konsolidaci mohou buďto poškodit či zvýšit, a to v závislosti na experimentálních podmínkách.

Naopak estrogen může schopnost prostorového učení zlepšit a také zablokovat negativní efekt GCs. Nicholas et al. (2006) zkonstruovali chimerický gen (ER/GR) obsahující hormon-vázající doménu glukokortikoidového receptoru a DNA vázající doménu receptoru estrogenu. Cílem pokusu bylo zjistit, zda tento gen sníží poškození paměti. Pokusným potkanům byly utlumeny signály z glukokortikoidových receptorů. Zvířata byla vystavena akutnímu stresu (stres omezením pomocí fixace končetin) nebo chronickému stresu (kombinace několika druhů stresorů – třesení, omezení, chlad...), aby se zajistila cirkulace GCs. Poté byla testována na prostorové učení v MVB. Zjistili, že vystavení akutnímu stresu před 24 hodinovým pokusem poškodilo schopnost vybavit si uložené poznatky. Expres ER/GR však tyto negativní efekty blokovala a zlepšila výkon v prostorovém učení.

Jiný způsob jak narušit fungování HPA osy použili ve svém výzkumu Conrad et Roy

(1993). Pokusným potkanům kmene Long-Evans dlouhodobě chirurgicky odstranili nadledvinky. Poté zvířata testovali nejprve 12 týdnů v MVB, pak 22 týdnů v 8-ramenném radiálním bludišti. Potkani byli schopni se učit v obou typech bludiště, i když byl jejich dentate gyrus velmi poškozen. Stresovaní jedinci projevili v MVB mírné poškození paměti, učili se pomaleji než kontrolní skupina. Při učení v radiálním bludišti nebylo žádné poškození nalezeno. Data tedy prokázala, že dentate gyrus je schopen i při dlouhodobém poškození dál správně fungovat. Toto fungování je zřejmě zajištěno díky hippocampální plasticitě.

2.2. Etologický přístup

Na rozdíl od fyziologického přístupu, při kterém se vliv stresu na učení zkoumá zejména pomocí přímé aplikace určitého množství hormonů do těla zvířete, je tento přístup zaměřen přímo na vliv různých stresových situací na chování zvířete. Vliv stresu na učení je pak stanoven pomocí experimentálních metod zkoumajících prostorové a operantní učení. Těmito stresovými situacemi jsou například: spánková deprivace, hladovění, stres z omezení, prenatální stres, stres z predátora, sociální stres, elektrošoky, handling a další formy různých stresorů.

2.2.1. Spánková deprivace

Spánková deprivace narušuje mnoho fyziologických procesů. V konečném důsledku může vést až k hyperfágii, ztrátě váhy, hypotermii či poškození imunitního systému (Youngblood et al., 1997). Kromě těchto fyziologických efektů má vliv i na kognitivní funkce (Youngblood et al., 1997). U hlodavců může způsobit různé změny chování, například zvýšenou agresivitu či snížené vnímání pocitu strachu (Youngblood et al., 1997). Negativní účinky na učení může mít spánková deprivace, která je navozena například dlouhodobým pozměňováním denního rytmu (Craig et McDonald, 2008).

Youngblood et al. (1997) se zabývali účinky spánkové deprivace na prostorové učení a paměť a to využitím takzvané „flower pot“ techniky, spánek potkanů narušili tím, že je umístili na malou plošinku, která se nacházela nad vodou. Potkani se nemohli pohybovat a museli se ustátit v jedné poloze. Spánek byl narušen pádem do vody, protože během spánku zvířata nebyla schopna se kvůli uvolnění svalů udržet na plošince. Takto stresovaní potkani byli opakovaně testováni v MVB. Po 4 dnech pokusů projevili stresovaní potkani poškození

prostorové paměti. Spánková deprivace způsobila i ztrátu váhy a zvýšení množství kortikosteronu v těle. Le Marec et al. (2001) také potvrdili poškození prostorové paměti u potkanů v MVB. Zvířata byla 4 hodiny stresována stejným způsobem jako v předešlé práci a poté umístěna do MVB, pozice plošinky byla měněna. Z experimentu však také vyplynulo, že spánková deprivace může zlepšit allocentrickou orientaci v prostoru.

Smith et al. (1998) zkoumali vliv stresu stejnou technikou jako předešlí autoři, pouze místo MVB použili k testování prostorového učení bludiště radiální. Samci laboratorních potkanů byli nejdříve podrobena tréninku v bludišti a poté jim byl v různých časových intervalech narušován spánek (hned po tréninku, po 4h, po 8h, po 12 h). Poté byli znovu testováni v radiálním bludišti. U spánkové deprivace, která následovala hned po skončení tréninku, se jednoznačně prokázalo poškození referenční paměti.

Palchykova et al. (2006) zase testovali, jaký vliv bude tento stres mít na diskriminační učení. K pokusu byl použit *Phodopus sungorus*. Zvířata byla nejprve trénována 3 způsoby: rozhodnout se mezi novým a starým objektem, vybrat si ze 3 rozdílných předmětů ten již známý, vybrat si ze dvou stejných objektů ten starý. Poté byli potkani 30 minut či 4 hodiny rušení během spánku (klepáním na klec, vkládáním tkanin do klece). A pak znovu testováni na diskriminační učení. Stresovaná zvířata projevila zhoršení učení při složitějších testech. Rozborem krve však zjistili, že působením stresu nestoupla hladina kortisolu a ani kortikosteronu.

Naproti tomu Smith et Gisquet-Verrier (1996) zjistili, že 24 hodinová spánková deprivace, která následovala hned po tréninku, napomohla ke zlepšení výkonu a uchování si poznatků z tréninku v různých testech na vyhnutí v Y-bludišti.

2.2.2. Nedostatek potravy

Je známo, že omezení příjmu potravy dokáže u hlodavců zmírnit nepříznivé následky procesu. Omezením potravy se tak může prodloužit maximální délka života a snížit náchylnost k chorobám (Mattson et al., 2003; Lipman et al., 1999; Yanai et al., 2004). Fitting et al. (2008) se proto domnívají, že tento způsob stresové deprivace by tedy mohl mít příznivé účinky i na učení. Některé práce však uvádějí, že trvalé snížení kalorií v dospělosti může mozek poškodit (Lee et al., 2000; Lee et al., 2002; Sapolsky, 1995); především ty oblasti mozku, které jsou pro funkce učení a paměti důležité.

Fitting et al. (2008) zkoumali možné zhoršení ve schopnosti prostorového učení způsobený právě omezením množství potravy. Denní porce potravy laboratorních potkanů byla postupně 2 týdny snižována až na 60% příjmu potravy kontrolní skupiny. Poté byli

potkani umístění do Morrisova vodního bludiště (MVB). V něm byla testována schopnost učení a paměti při hledání ponořené plošinky. Při pokusech zjistili, že trvalé omezení potravy zlepšilo výkon potkana, obzvláště po opakování pokusu druhý a třetí den. Výsledkem tedy bylo zmírnění zhoršení schopnosti učit se způsobeného stárnutím.

Jiným příkladem, kdy mělo snížení příjmu potravy pozitivní účinky na učení hlodavců, je výzkum Roberge et al. (2008). Zkoumali působení trvalého omezení potravy na hippocampus poškozený ischemií. Dlouhodobými výzkumy bylo zjištěno, že po celkové ischemii předního laloku dochází k odumírání neuronů v hippocampu, které má pak za následek zhoršení prostorového učení a paměti (Colbourne et Corbett, 1995). K pokusu byli použiti samci laboratorních potkanů a byly stanoveny 4 pokusné skupiny (ischemie s omezením potravy, ischemie bez omezení potravy, bez ischemie s omezením potravy, bez ischemie bez omezení potravy). Omezení potravy na 60% normální stravy probíhalo po dobu 3 měsíců. Poté byly potkani testováni ve 2 typech radiálního bludiště. Obě ischemické skupiny projevily více chyb než skupiny s bez ischemií, ale ischemická skupina s omezeným příjmem potravy měla chyb méně. Mírná dieta tedy umožňuje uchování prostorové paměti u ischemických zvířat s omezenou potravou. Zajímavé je, že obě skupiny ischemických potkanů měly srovnatelné fyzické poškození hippocampu. Autoři uvažují o tom, že omezení potravy vytváří takové změny v mozku, které umožňují účinnější učení a paměť, například posílením jiné oblasti mozku ke splnění úkolu.

Andrade et al. (2002) naopak ve svém výzkumu zjistili, že díky omezení potravy dochází k poškození operantního učení. Testovaní laboratorní potkani byli opět krmeni 60% množství z normální stravy, část z nich však byla po určité době znovu krmena normálně. Poté podstoupili testy zkoumající prostorové a operantní učení. Ve výsledcích MVB se obě tyto zkoumané skupiny signifikantně nelišili od skupiny kontrolní. Avšak v testu pasivního vyhnutí se skupina s omezenou potravou i rehabilitovaná skupina projevily neschopnost zvládnout tento úkol. Znamená to, že deprivace potravou může poškodit naučení se uniknout před bolestivými stimuly. Příčinou tohoto špatného výsledku při operantním učení však může také být hyperaktivita stresovaných zvířat (skákání do zdí boxu, padání na podlahu, otáčení se).

2.2.3. Stres omezením

Stres omezením spočívá ve vystavení hlodavce takovému druhu stresoru, před kterým není úniku. Omezení může způsobit poškození schopnosti učení nebo zhoršit proces neurogeneze v oblasti hippocampu (Pham et al., 2003). Takovým stresorem může být například zafixování končetin, znehybnění celého těla či umístění zvířete do malého prostoru.

Klenerová et al. (2003) aplikovali na zvířata dvě formy stresu. Společně se znehybněním končetin použili i chladnou vodou (22°). Pokusní potkani byli nejdříve trénováni v pasivním učení vyhnutí. Poté byli vystaveni stresu zafixováním všech končetin a ponořením do vody. Dále bylo otestováno učení vyhnutí pomocí dvoudílné klece, kde unikali z místa působení elektrického proudu. Bylo zjištěno, že stres, který byl praktikován krátce před učením, poškození paměti způsobil. Avšak stresování, které proběhlo 4 hodiny před učením, už nemělo na paměť žádný vliv.

Radecky et al. (2005) se zase zabývali hypotézou, zda infuze mozkového neurotrofického proteinu (BDNF), který se ukázal být dobrou ochrannou centrální nervové soustavy před různými zraněními, může zlepšit poškození prostorového učení a paměti, které vzniklo působením stresu omezením. Stresovaná zvířata byla celkově imobilizována v plastickém boxu a obrácena na záda po dobu 2 hodin denně. Po 7 dnech byla zvířata testována na prostorové učení v MVB. Zjistili, že stres způsobený omezením poškodil prostorové učení a zvýšil hladinu kortikosteronu. BDNF však dopady stresu zmínil.

Buchanan et al. (2008) také zkoumali vliv omezení na schopnost prostorového učení. K pokusu použili BALB/c myši. Nejdříve zvířata prošla tréninkem v MVB s nestálou pozicí plošiny. Poté byly myši stresovány omezením pohybu, a to před každým pokusem, kdy se pozice plošinky měnila. Bylo zjištěno, že vystavení stresu omezením poškodilo prostorové učení.

Výzkum Luine et al. (1996) zase prokázal, že různá délka vystavení stresu omezením přináší odlišné výsledky. 13ti-denní stres totiž schopnost učení v radiálním bludišti zvýšil, zatímco 21ti-denní stresování přineslo poškození prostorové paměti.

Bland et al. (2000) po dobu 10 dní různými způsoby znehybňovali potkanům s ischemií přední končetiny. Poté je umístili do MVB. Avšak MVB a ani měření hladiny stresových hormonů neprokázalo žádné rozdíly.

2.2.4. Prenatální stres

Klinické studie ukázaly, že prenatální stres způsobuje narušení poznávacích procesů a může u potomků v dospělosti zvýšit senzitivitu HPA osy a náchylnost k onemocněním. Prenatální stres může také zapříčinit různé psychologické poruchy (hypoxii, arteriální hypertenzi, bradykardii) (Welberg et Seckl, 2001).

Bylo prokázáno, že imobilizační chronický stres během posledního týdne březosti má na prostorové učení škodlivý vliv. Tento negativní vliv je spojen s inhibicí neurogeneze hippocampu (Lemaire et al., 2000). Yang et al. (2006) se také zabývali škodlivými účinky

prenatálního stresu na hippocampální synaptickou plasticitu u potkaních mláďat. Samice Wistar potkanů byly během březosti vystaveny stresu působením elektrických šoků ve Skinnerově boxu. Po narození byla mláďata testována na prostorové učení v MVB. Zjistili, že prenatální stres zvýšil následky akutního stresu a poškodil prostorové učení a paměť.

Výzkum Szurana et al. (2000) na Wistar potkanech zase ukázal, že prenatální stres způsobuje rozdílné výsledky u pohlaví. Bylo zjištěno, že dojde k poškození učení u samců, ale ne u samic.

Dlouhodobý efekt mateřského stresu na učení a hippocampus zkoumali i Hoon Son et al. (2006). Na březí samice kmene ICR myši byl aplikován stres omezením. Potomky pak testovali na prostorové učení ve 2 typech radiálního bludiště. Prostorové učení a paměť mláďat bylo působením prenatálního stresu poškozeno.

Jednou z forem prenatálního stresu může být i infekce. Lanté et al. (2008) ji vyvolali u březích samic Sprague-Dawley potkanů. Testování proběhlo v MVB. Došlo k poškození prostorové paměti.

Fuentes et al. (2007) vystavili samice CD1 myši prenatálnímu stresu omezením a část z nich i aplikaci perfluorooktanu sulfonate (PFOS). Poté byla mláďata umístěna do MVB. Skupina, která prodělala stres i aplikaci PFOS měla sníženou mobilitu. Prenatální stres vedl ke snížení hladiny kortikosteronu.

V posledním týdnu březosti stresovali samice CD1 myši i Meek et al. (2000). Formy stresu byly různé (hluk, handling, světlo, zvýšená teplota). Potomci byli testováni opět v MVB. Stresovaní byli v učení pomalejší než nestresovaní. Z výsledků tak vyplývá, že díky prenatálnímu stresu dojde ke vzniku poruch v pohybovém chování a učení. A že tyto poruchy pak zpomalují rychlost učení v dospívání.

2.2.5. Stres z predátora

Obranné chování má spojitost se strachem, úzkostí a stresem a bývá často vysoce specifické. Mnoho studií, zkoumajících obranné chování, je založeno právě na konfrontaci hlodavců s predátorem nebo nějakým nepodmíněným stimulem predátora (např. pach predátora) (Dell’Omo et Alleva, 1994; Berton et al., 1998). Klasickým příkladem jsou „Mouse Defense Test Battery“ (Blanchard et al., 1998) nebo „Rat Exposure“ test (Diamond et al., 2006; Yang et al., 2004). Vystavení takovému stresoru může u hlodavce vyvolat agresivní chování, zamrznutí nebo zvědavost a snahu prozkoumat ho.

Bonsignore et al. (2008) testovali hypotézu, zda bezprostřední strach může ovlivnit učení

v Morrisově vodním bludišti (MVB). Při pokusu byly použity CD-1 myši, které byly vystaveny přítomnosti predátora (v tomto případě potkana) přímo během pokusu. Byly stanoveny 2 pokusné skupiny, přičemž první byla v přítomnosti potkana pouze během pokusu, zatímco druhé skupině byl predátor ukázán již několik dní před zahájením pokusů v MVB a poté i během pokusu. Zvířata vystavena přítomnosti živého predátora se chovala při hledání plošiny zvláště a často se potápěla nebo plavala jen při zdi. Skupina, která viděla predátora jen během pokusu hledala plošinu lépe, zatímco skupina vystavená potkanovi před začátkem testů prostorového učení prokázala horší výkon v počátečních fázích pokusu. Nicméně rozdíly mezi skupinami v MVB nebyly průkazné, protože zvláštní změny v chování stresovaných myší během pokusu mohly schopnost učení ovlivnit.

Abu-Ghanem et al. (2008) testovali pomocí geneticky upravených myší (NOS2 mutantů) jejich odpověď na stres způsobený predátorem. Chtěli dokázat, že mutací způsobené úpravy jsou spojeny s vysokou vnímavostí zvířat ke stresovému stimulu a se zvýšením úzkostného chování. Nejdříve byla testována jejich schopnost učení v MVB. Poté byla část myší stresována umístěním do bedny s kočičím pachem a pak znovu testována pomocí bludiště. Myši, které byly geneticky upraveny, měly v první části lepší výsledky než nemutanti. Ale tento pozitivní účinek zmizel po vystavení zvířat stresu.

Diamond et al. (2006) zkoumali, zda může vystavení kočky chování narušit dlouhodobou paměť (24 h test). Ve svých předchozích pracích zjistili, že potkan vystavený akutnímu stresu projevuje poškození prostorové paměti (Diamond et al., 1999; Woodson et al., 2003; Sandi et al., 2005). Tímto svým novým výzkumem tak chtěli prokázat hypotézu, že dlouhodobá prostorová paměť, a její zhoršení díky psychologickému stresu, jsou spojeny se vznikem výběžků dendritů v CA1 oblasti hippocampu. Stres působící na potkana před 24 h testem paměti by tedy měl poškodit znovunalezení již uložené informace, ale zároveň blokovat snížení hustoty výběžků. Nejdříve byli trénováni v radiálním vodním bludišti. Poté byly dvě skupiny vystaveny stresoru – kočce. První skupině byla kočka ukázána hned před tréninkem ve vodním bludišti, druhé až před 24 h paměťovým testem. U skupiny první, na kterou působil akutní stres, došlo k poškození dlouhodobé paměti ale k žádným změnám hustoty výběžků. U druhé skupiny, došlo také k poškození dlouhodobé paměti, ale zároveň se hustota dendritických výběžků zvýšila. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že jeden den vodního tréninku způsobí snížení referenční paměti a zvýší hustotu výběžků v oblasti CA1. Stres před tréninkem tedy brání konsolidaci informace do dlouhodobé paměti a potlačuje tréninkem zvýšenou hustotu výběžků. Stres před 24 h paměťovým testem zase poškozuje znovunabytí

informací uložených v paměti, ale nesnižuje tréninkem získané zvýšení hustoty dendritických výběžků.

2.2.6. Sociální stres

Chování zvířat v izolaci je významný způsob zkoumání sociálního stresu. Takzvaný syndrom izolace je popisován jako spontánní a podmíněná pohybová hyperaktivita, charakterizovaná zvýšenou odpovědí na nové prostředí a vyšší tendencí zachránit se. Tento způsob stresu však může procesy učení a paměti poškodit (Myhrer, 1998). Izolace hlodavců hned po odstavení totiž vede k dlouhotrvajícím změnám, jako jsou neofobie, agrese, pohybová strnulost či snížení synaptické plasticity hippocampu (Fone et Porkess, 2008). Dalším příkladem sociálního stresu je vystavení hlodavce vetřelci či dominantnímu jedinci stejného druhu (Pardon et al., 2004).

Vliv sociálního stresu na učení a paměť u hlodavců pomocí izolace zkoumali například Lu et al. (2003). Laboratorní potkani byli izolováni buď po jednom nebo chováni ve skupině. Pokusy probíhaly ve dvou časových intervalech. V prvním byla zvířata izolována po 4 týdny, ve druhém po 8 týdnů a do pokusu byla zahrnuta další skupina potkanů (4 týdny izolace po jednom, následující 4 týdny izolace ve skupině). Poté byla zvířata testována v MVB. Bylo zjištěno, že potkani, kteří byli 4 týdny izolovaní po jednom, projevili větší poškození prostorového učení než potkani chováni 4 týdny ve skupině. Stejný rozdíl ve schopnosti nalézt plošinku byl objeven i u potkanů chovaných v 8. týdenní izolaci. Celkově tedy měli potkani, kteří byli chováni ve skupinách, lepší výsledky než potkani izolovaní po jednom. Zajímavostí je, že skupina potkanů, která byla nejdříve 4 týdny izolována po jednom a poté další 4 týdny ve skupině, projevila počáteční poškození při učení prostorové paměti, avšak díky následnému chování ve skupině se její učení opět zlepšilo.

Podobně postupovali při svém výzkumu i Del Arco et al. (2004). Potkany rozdělili do dvou skupin (izolovaní po jednom, chováni ve skupině). Po 8 týdnech testovali jejich schopnost učení pomocí testu pasivního vyhnutí. Izolovaní potkani projevili druhý den testů poškození v zachování paměti.

Pardon et al. (2004) se zabývali sociálním stresem způsobeným agresorem. Část laboratorních myši byla nejprve vycvičena k agresivnímu dominantnímu chování. Na začátku pokusu pak byli neagresivní samci vloženi do dvojité klece, do druhé části byl vložen samec dominantní. Pokusná zvířata se mohla vidět, cítit a slyšet, ale bylo jim zabráněno v přímém kontaktu. Po 4 týdny trvající expozici stresu byla zvířata umístěna do T-bludiště. Cílem bylo zvolit si správné rameno. Dlouhodobě stresované myši prokázaly nepatrné poškození paměti.

Podobný výzkum realizovali také Touyarot et al. (2004). K pokusu použili samce Wistar potkanů. Ti byli vždy umístěni do klece k agresivnímu potkanu jiného druhu. Jedince stresovali střetem s agresorem po 21 dní. Poté vliv stresu testovali na prostorovém učení v MVB. Přímý střet s agresorem měl na prostorové učení hlodavců negativní vliv.

2.2.7. Elektrošoky

Elektrošoky jsou již dlouho používanou motivací pro operantní učení. Stres vyvolaný elektrickými stimuly však působí na CA1 oblast hippocampu, způsobuje ztrátu neuronů a může tak přivodit poruchy učení prostorové paměti.

Lukoyanov et al. (2004) zkoumali, zda mírné působení elektrických stimulů ovlivní prostorové učení. Na Wistar potkany byl 6x aplikován elektrický stimul. Po 2 klidových měsících byli umístěni do MVB. První 4 dny si stresovaní vedli špatně, ale pak se jejich učení vyrovnalo s kontrolní skupinou. Z výsledků také vyplývá, že elektrické šoky mohou způsobit mnoho morfologických a funkčních změn v hippocampu.

Gilbert et al. (1996) se zabývali působením elektrických stimulů na oblast CA1 hippocampu. Existují 2 způsoby stimulace a oba se testují pomocí prostorového učení. Každý však spočívá ve stimulaci jiného místa. Stimulace CA1 oblasti je využívána především pro radiální bludiště, zatímco stimulace oblasti kontralaterální entorhinální kůry pro MVB. V tomto pokusu však chtěli zjistit působení stimulů na CA1 oblast v MVB. Long-Evans potkanům byla nejprve nainstalována elektroda do oblasti CA1 stratum radiatum, poté prošli tréninkem. Po 24 hodinách byli umístěni do Faradaovy klece a stimulováni elektrickými impulsy. Stimulací oblasti CA1 hippocampu došlo k poškození akvizice prostorového učení..

Kelsey et al. (2000) zase testovali druhý způsob - stimulaci perforující nervové dráhy. K pokusu byli použiti Sprague-Dawley potkani, kterým byla nainstalována do oblasti hippocampu elektroda. Poté je umístili do MVB. Stimulací došlo k záchvatům, poškození prostorového učení a ztrátě neuronů v dorsálním hippocampu.

Schopnost učení u několika kmenů myší po stresování elektrošoky srovnávali pomocí různých pokusů Francis et al. (1995). Ve druhém pokusu například dali myším elektrošok před umístěním do MVB. Na učení to nemělo žádný vliv. Ve třetím pokusu byla zvířata nejprve 14 dní trénována v klasickém MVB, poté byla pozice plošinky změněna a na ně aplikován elektrický šok. První den měly všechny kmene horší výsledky než v tréninku. V dalším pokusu použili 2 kmene, v bludišti byla buď skrytá nebo viditelná plošina. Stres ovlivnil pouze učení u kmene BALB, a to v případě skryté plošiny.

Rozdílným vlivem okamžitého a dlouhotrvajícího stresu na učení se zabývali například

Xiong et al. (2003). Jedna část Wistar potkanů byla vystavena mírnému stresu (umístěním na vyvýšenou plošinu), část druhá silnému stresu způsobeném elektrošoky. Poté byli testováni na prostorové učení v MVB po okamžitém a dlouhotrvajícím působení stresů. Slabý stres neměl na učení vliv, ale u okamžitého stresu byly horší výsledky v ověřovacím pokusu. Silné působení stresu učení ovlivnilo a u dlouhotrvajícího v ověřovacím pokusu zlepšilo výsledky.

2.2.8. Další etologické metody

Postnatální stres

Postnatální stres je stres, který je způsoben krátce po narození mláděte. Mláďata jsou v tomto věku velice zranitelná a proto není těžké u nich stres vyvolat. Stres může být způsoben například změnami prostředí, způsobením bolesti, izolací od matky či sourozenců nebo raným handlingem (Pryce et Feldon, 2003).

Schellinck et al. (2003) zkoumali vliv postnatálního stresu způsobeného bolestí. Pokusné CD1 myši byly staré jen 8-14 dní. První skupině byla způsobena bolest jednorázovým píchnutím do tlapky, druhé opakovaným. Poté byla testována jejich schopnost učení v MVB. Stres neměl na učení žádný vliv.

Magnetické pole

Extrémně nízká frekvence magnetického pole (ELFMF) může mít různé biologické efekty, ovlivnit aktivitu mozku či změnit způsob chování. Avšak normální frekvence (například u mobilu) učení neovlivní (Dubreuil et al., 2003).

Mostafa et al. (2002) zkoumali vliv chronického vystavení ELFMF o intenzitě 2 G na učení u Wistar potkanů a na hladinu kortikosteronu v jejich krvi. Ke zkoumání učení byla zvolena metoda rozpoznávání předmětů při volné exploraci. U stresovaných zvířat došlo k narušení schopnosti diskriminačního učení při rozpoznání „nového a starého“ předmětu. Hladina kortikosteronu signifikantně vzrostla.

Li et al. (2007) se zase zabývali odlišným působením nízké dávky (0.5 Hz) transkraniální magnetické stimulace (TMS) na prostorovou paměť při akutním či chronickém stresu. Pokusní Wistar potkani byli dlouhodobě či krátkodobě vystaveni TMS a poté testováni v MVB. Chronická nízká frekvence poškodila schopnost vybavení si krátkodobé a dlouhodobé referenční paměti. Akviziční proces pracovní paměti však narušen nebyl. Akutní nízká frekvence měla negativní vliv jen na dlouhodobou referenční paměť.

Podchlazení

Tato forma stresu se používá při výzkumu perinatální asfyxie (PA). PA způsobuje velké morfologické změny, ztrátu neuronů a celkově narušuje proces učení. Těmto negativním změnám můžeme předcházet právě použitím hypotermie (Hoeger et al., 2000).

Loidl et al. (2000) zkoumali vliv AP a hypotermie na prostorové učení v MVB. Podchlazení nemělo na učení žádný vliv. Hypotermie ale prodloužila délku života zkoumaných zvířat.

Hoeger et al. (2006) zase ve svém výzkumu zjistili, že podchlazení nejenom chrání mozek a procesy učení před poškozením AP, ale že učení i zlepšuje. Hypotermie tedy zabraňuje poškození mozku AP především z hlediska funkčnosti.

Vysoká teplota

Působení vysokých teplot je jedním z mnoha stresů, se kterými se běžně setkáváme ve volné přírodě. Vysoké teploty bývají často limitujícím faktorem. Výsledným efektem jejich působení může být v krajním případě i úhyn zvířete z důvodu přehřátí organismu. V laboratorních podmínkách může být takový stres navozen zvýšením teploty okolního prostředí. Takovým způsobem zvýšili teplotu u Fischer 344 potkanů i Lieberman et al. (2005). Části potkanů byl také aplikován tyrosin, který vliv stresu zmírňuje. Jakmile tělesná teplota stoupla o 2°C umístili potkany do MVB. Stresovaní jedinci projevili horší učení s přítomností, i bez přítomnosti tyrosinu.

3. Diskuse

Tato studie ve formě rešerše se zabývá 2 různými přístupy ve zkoumání vlivu stresu na učení. Byly popsány jednotlivé přístupy a metody, kterými se vliv stresu na učení zkoumá. Cílem této práce je ale především určit formy stresu, které mohou učení a paměť poškodit, nebo naopak zlepšit.

3.1. Fyziologický přístup

První metodou fyziologického přístupu je aplikace stresových hormonů do těla zvířete. Aplikací hormonů dochází ke zvýšení jejich hladiny v krvi a navození stresu. Z většiny studií plyne, že chronické dávkování způsobuje poškození prostorové paměti. Například Coburn-Litvak et al. (2003) došli ve svém výzkumu k závěru, že na prostorové učení v Y-bludišti mělo negativní vliv pouze delší dávkování. Avšak krátkodobá vysoká hladina kortikosteronu učení napomáhá (Hebda-Bauer et al., 1999). Přesto ale aplikací a působením stresových hormonů dochází k narušování procesu vybavení si.

Metodou druhou je narušení fungování HPA osy. Conrad et Roy (1993) například potkanům chirurgicky odstranili nadledvinky. Přesto byla zvířata schopná učení v obou druhých bludiště. Z toho tedy vyplývá, že dentate gyrus dokáže fungovat i při velkém poškození. Nicholas et al. (2006) zase pomocí chimerického genu dokázali, že jeho exprese může blokovat negativní efekty způsobené akutním stresem.

Z těchto výsledků tedy usuzují, že chronické dávkování hormonů má na učení účinky negativní, zatímco akutní stres učení napomáhá. Narušením HPA osy sice dojde k poškození hippocampu, ale nejsou tím ovlivněny jeho funkce.

3.2. Etologický přístup

První etologickou metodou, která způsobuje stres u hlodavců, je spánková deprivace. Z většiny studií vyplývá, že tento způsob vystavení stresu zhoršuje podmiňování a prostorové učení. Opakem je výzkum Palchykové et al. (2006), ve kterém prokázali, že poškození diskriminačního učení není způsobeno stresem, ale náročností úkolu. Výsledky Smith et Gisquet-Verrier (1996) také ukazují, že 24 hodinová spánková deprivace hned po tréninku zlepšila výkon a uchování si poznatků v testech na avoidanci. Z toho tedy vyvozují, že

spánková deprivace poškozuje především prostorové učení, ale že její krátkodobé působení může mít na učení i pozitivní vliv.

Další metodou je deprivace potravy. Z prací vyplývá, že dlouhodobé snížení příjmu kalorií na 60 % původního množství pozitivně ovlivňuje prostorové učení u hlodavců. Andrade et al. (2002) ale zjistili, že omezení potravy negativně působí na učení operantní. Kalorie se také nesmí snížit trvale (Lee et al., 2002). Podle mého názoru tedy stres omezením potravy pozitivně ovlivňuje prostorové učení, avšak na operantní má vliv negativní. Trvalé snížení kalorií ale naopak může způsobit ztrátu neuronů.

Všeobecným předpokladem je, že stres omezením má na učení a paměť negativní vliv. Většina studií tento předpoklad potvrdila. Bylo zjištěno, že dlouhodobý stres omezením poškozuje prostorové učení. Okamžitý stres měl také negativní vliv na učení operantní (Klenerová et al., 2003).

Prenatální stres je považován za zdraví škodlivý. Z všech prostudovaných prací jednoznačně vyplývá, že stres způsobený v prenatálním období má na učení negativní vliv. Způsobuje poruchy prostorového učení i paměti. Obzvláště jeho dlouhodobý vliv může zapříčinit poruchy učení v dospívání (Hoon Son et al., 2006).

Působení psychologického stresu, jako je vystavení jedince predátorovi, se považuje za traumatizující zážitek, který může poškodit procesy chování. Mnou zkoumané studie prokazují, že stres z predátora má na učení negativní vliv, a to především na dlouhodobou paměť. Výsledky pokusu Bonsignore et al. (2008) sice také ukazují poškození prostorové paměti, ale jsou neprůkazné z důvodu zvláštního chování myší. Podle mého názoru však akutní stres způsobený vystavením predátorovi zhoršuje prostorové učení u myší i potkanů.

Sociální stres hraje v životě zvířat důležitou roli. Například izolace mláďat od matky může mít signifikantní dopad na další život hlodavce, stejně tak konfrontace zvířete s nějakým agresorem. Z prostudovaných prací vyplývá, že vystavení jedince agresorovi způsobilo poškození prostorového učení a paměti. Izolace jedince měla na učení také negativní dopad. Zajímavý výsledek plyne ze studie Lu et al. (2003). Potkani, kteří byli nejdříve stresováni po jednom projeví počáteční poškození prostorového učení, ale jakmile byli umístěni do skupiny, jejich učení se vylepšilo. Z těchto výsledků usuzuji, že pro zvířata je důležité žít v sociálním prostředí, aby se mohli správně vyvíjet a učit. A také, že vystavení hlodavce nějakému agresoru naruší jeho chování a poškodí tak jeho schopnost se učit.

Elektrošoky jsou často používány v pokusech zkoumajících operantní učení. Avšak stres jimi vyvolaný může mít na hippocampus a funkce mozku negativní vliv. Velké dávky elektrického proudu dokáží způsobit i ztrátu paměti. Studie prokázaly, že mírné působení

elektrických stimulů má na učení vliv pouze v ověřovacích pokusech. Prostorové učení poškozuje především okamžitý stres, ale silný stres dlouhodobý ho může zlepšit. Francis et al. (1995) také zjistili, že při použití různých kmenů myši, se může dospět k odlišným výsledkům. Podle mého názoru, elektrošoky mohou mít v přiměřené dávce pozitivní účinky.

Po narození je velmi důležité prostředí a interakce, ve kterých mláďata vyrůstají. Ze studie Schellinck et al. (2003) však vyplývá, že stres způsobený v tomto období pomocí bolesti neměl na učení žádný vliv. Vzhledem k omezenému počtu prací zabývajících se touto tematikou není možné adekvátně posoudit, zda metoda postnatálního stresu učení opravdu neovlivňuje.

S působením magnetického pole na živočichy se můžeme setkat všude okolo nás. Normální frekvence nemá na jednání živočichů většinou žádný vliv, ale u extrémně nízké frekvence je tomu jinak. Výsledky prací ukazují, že extrémně nízká frekvence magnetického pole může učení poškodit, a to především dlouhodobou referenční paměť a schopnost diskriminačního učení. Na proces akvizice negativní vliv nemá.

Vznik stresu na základě působení extrémních teplotních hodnot je ve volné přírodě běžným úkazem. Tyto extrémní stresy mohou v konečné fázi vést až k úhynu zvířete. Ze studií, zabývajících se hypotermií vyplývá, že tato forma stresu může zlepšit učení, které bylo poškozeno perinatální asfexií. Podle mého názoru tedy může mít podchlazení, i když je formou stresu, na učení pozitivní účinky. Naproti tomu má vysoká teplota podle výsledků vyplývajících ze studie Lieberman et al. (2005) na prostorové učení negativní vliv.

3.3. Optimální hladina stresu

Optimální hladina stresu je takové množství stresu, které aplikováním na jedince nezpůsobí narušení mozku a učení. To znamená optimální dávka hormonů, která má na učení pozitivní vliv.

Stanovit optimální hladinu stresu u fyziologického přístupu lze pomocí aplikace přesného množství stresového hormonu do těla zvířete. Toto množství může být poté zvyšováno či snižováno. Díky tomu by se mohla dát určit hladina stresu, při které by bylo učení pozitivně ovlivňováno.

U etologického přístupu bude složitější stanovit přesnou hladinu stresu, při které dochází k narušení funkcí mozku a schopnosti učení. U většiny etologických metod nelze totiž v praxi nastavit přesné množství stresových hormonů v těle zvířete. Optimální hladina stresu proto

půjde určit jen u těch metod, u kterých lze manipulovat s délkou, počtem či mírou působení stresu.

Není mi známo, že by byla publikována práce, která by se zabývala stanovením přesné hladiny stresových hormonů ovlivňujících učení. Z tohoto důvodu se mohu pouze domnívat, jakým možným způsobem by se takové stanovení dalo praktikovat v praxi. Ze studií však vyplývá, že alespoň u fyziologického přístupu je pro učení vhodnější vyšší hladina kortikosteronu v těle.

4. Závěr

Tato práce je prvním srovnáním jednotlivých přístupů a metod, kterými se vliv stresu na učení zkoumá. Bylo zjištěno, že při chronickém dávkování hormonů u fyziologického přístupu dochází k poškození prostorové paměti. Zároveň má ale krátkodobá vysoká hladina kortikosteronu na učení vliv pozitivní. Etologické metody pak mají na učení u hlodavců z větší části negativní vliv, a to především na prostorové učení a referenční paměť. Přesto existují etologické metody, které mohou učení ovlivnit i pozitivně. U některých metod můžeme při výzkumu obdržet odlišné výsledky. Ty jsou především způsobeny rozdílným vlivem akutního či chronického stresu na jednotlivé etologické metody.

Většina pokusných zvířat byli laboratorní potkani a myši, použití druhu *Phodopus sungorus* bylo výjimkou. Myslím si, že rozšíření pokusných zvířat by mohlo v budoucnu poskytnout zajímavé výsledky.

U některých etologických metod jsou zkoumané objekty stresovány pomocí faktorů, které mohou na zvíře působit i v běžném životě. Proto si myslím, že výsledky takového výzkumu by mohly v budoucnu pomoci pochopit například vývoj různých neurologických a psychiatrických chorob.

V magisterském studiu bych se ráda zabývala využitím získaných poznatků v praktickém výzkumu. A to testováním vlivu na učení nějaké stres způsobující etologické metody.

5. Literatura

- Abu-Ghanem Y., Cohen H., Buskila Y., Grauer E., Amitai Y. Enhanced stress reactivity in nitric oxide synthase type 2 mutant mice: Findings in support of astrocytic nitrosative modulation of behavior. *Neuroscience* 2008; 156: 257–265
- Akirav I., Kozenicky M., Tal D., Sandi C., Venero C., Richter-Levin G. A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learning & Memory* 2004; 11: 188-195
- Andrade J.P., Lukoyanov N.V., Paula-Barbosa M.M. Chronic food restriction is associated with subtle dendritic alterations in granule cells of the rat hippocampal formation. *Hippocampus* 2002; 12: 149–164
- Berton F., Vogel E., Belzung C. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiology & Behavior* 1998; 65: 247–254
- Bland S.T., Schallert T., Strong; R.r, Aronowski J., Grotta J.C., Feeney D.M. Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats : functional and anatomic outcome. *Stroke* 2000; 31: 1144-1152
- Blanchard R.J., Hebert M.A., Ferrari P.F., Palanza P., Figueira R., Blanchard D.C., Parmigiani S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology & Behavior* 1998; 65: 201–209
- Bonsignore L.T., Chiarotti F., Alleva E., Cirull F. Assessing the interplay between fear and learning in mice exposed to a live rat in a spatial memory task (MWM). *Anim Cogn* 2008; 11: 557–562
- Bowman R. E. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. *Journal of Neuroendocrinology* 2005; 17: 526–535
- Brennan F.X. Genetic differences in leverpress escape/avoidance conditioning in seven mouse strain. *Genes, Brain and Behavior* 2004; 3:110-114
- Buchanana J.B., Sparkmana N.L., Chena J., Johnsona R.W. Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33: 755–765
- Coburn-Litvak P.S., Pothakos K., Tata D.A., McCloskey D.P., Anderson B.J. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 2003; 80: 11–23

- Colbourne F., Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *Journal of Neuroscience* 1995; 15(11): 7250–7260
- Conrad C.D., Roy E.J. Selective loss of hippocampal granule cells following adrenalectomy: Implications for spatial memory. *Journal of Neuroscience* 1993; 13: 2582-2590
- Craig L.A., McDonald R.J. Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Research Bulletin* 2008; 76: 141–151
- Del Arco A., Zhu S.W., Terasmaa A., Mohammed A.H., Fuxe K. Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum. *Psychopharmacology* 2004;171: 148–155
- Dell’Omo G., Alleva E. Snake odor alters behavior, but not pain sensitivity in mice. *Physiology & Behavior* 1994; 55: 125–128
- Diamond D.M., Park C.R., Heman K.L., Rose G.M. Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus* 1999; 9: 542–552
- Diamond D.M., Campbell A.M., Park C.R., Woodson J.C., Conrad C.D., Bachstetter A.D., Mervis R.F. Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus* 2006; 16: 571-576
- Dubreuil D., Jay T., Edeline J. Head-only exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields does not alter rat’s memory in spatial and non-spatial tasks. *Behavioural Brain Research* 2003; 145: 51–61
- Fitting S., Booze R.M., Gilbert C.A., Mactutus C.F. Effects of chronic adult dietary restriction on spatial learning in the aged F344×BN hybrid F1 rat. *Physiology & Behavior* 2008; 93: 560–569
- Fletcher Q. E., Boonstra R. Impact of live trapping on the stress response of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Zoology* 2006; 270: 473–478
- Fone K.C.F., Porkess V.M. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2008; 32: 1087–1102
- Francis D.D., Zaharia M.D., Shanks N., Anisman H. Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: Interstrain variability. *Physiology & Behavior* 1995; 58(1): 57-65
- Fuentes S., Colomina M.T., Vicens P., Domingo J.L. Influence of maternal restraint stress on the long-lasting effects induced by prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) in mice. *Toxicology Letters* 2007; 171: 162–170

- Gerlai R. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. *Behavioural Brain Research* 1998; 95: 91-101
- Gilbert T.H., McNamara R.K., Corcoran M.E. Kindling of hippocampal field CA1 impairs spatial learning and retention in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research* 1996; 82: 57-66
- Harper J.M., Austad S.N. Fecal glucocorticoids: A noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology* 2000; 73(1): 12–22
- Hebda-Baner E.K., Morano M.I., Therrien B. Aging and corticosterone injections affect spatial learning in Fischer-344×Brown Norway rats. *Brain Research* 1999; 827: 93-103
- Hoeger H., Engelmann M., Bernert G., Seidl R., Bubna-Lit&z H., Mosgoeller W., Lubec B., Lubec G. Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Sciences* 2000; 66(10): 947-962
- Hoeger H., Engidawork E., Stolzlechner D., Bubna-Littitz H., Lubec B. Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. *Amino Acids* 2006; 31: 385–396
- Hon Son G.H., Geum D., Chung S., Kim E.J.; Jo J., Kim Ch., Lee K.H., Kim H., Choi S., Kim H.T., Lee Ch., Kim K. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(12): 3309 –3318
- Hui G.K., Figueroa I.R., Poytress B.S., Roozendaal B., McGaugh J.L., Weinberger N.M. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 2004; 81: 67–74
- Keay J.M., Singh J., Gaunt M.C., Kaur T. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2006; 37(3): 234–244
- Kelsey J.E., Sanderson K.L., Frye Ch.A. Perforant path stimulation in rats produces seizures, loss of hippocampal neurons, and a deficit in spatial mapping which are reduced by prior MK-801. *Behavioural Brain Research* 2000; 107: 59–69
- Kim J.J., Lee H.J., Han J.-S., Packard M.G. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal Of Neuroscience* 2001; 21: 5222-5228

- Klenerová V., Jurčovičová J., Kaminský O., Šída P., Krejčí I., Hlišák Z., Hynie S. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behavioural Brain Research* 2003; 142: 143–149
- Lanté F., Meunier J., Guiramand J., De Jesus Ferreira M., Cambonie G., Aimar R., Cohen-Solal C., Maurice T., Vignes M., Barbane G. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus* 2008; 18: 602-609
- Le Marec N., Beaulieu I., Godbout R. Four hours of paradoxical sleep deprivation impairs alternation performance in a water maze in the rat. *Academic Press* 2001; 195-197
- Lee A.L., Ogle W.O., Sapolsky R.M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disorders* 2002; 4(2): 117–28
- Lee J., Herman J.P., Mattson M.P. Dietary restriction selectively decreases glucocorticoid receptor expression in the hippocampus and cerebral cortex of rats. *Experimental Neurology* 2000; 166(2): 435–41
- Lemaire V., Koehl M., Le Moal M., Abrous D.N. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceeding Natl. Academy Science* 2000; 97: 11032-11037
- Li W., Yang Y., Ye Q., Yanga B., Wang Z. Effect of chronic and acute low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on spatial memory in rats. *Brain Research Bulletin* 2007; 71: 93–500
- Lieberman H.R., Georgelis J.H., Maher T.J., Yeghiayan S.K. Tyrosine prevents effects of hyperthermia on behavior and increases norepinephrine. *Physiology & Behavior* 2005; 84: 33–38
- Lipman R.D., Dallal G.E., Bronson R.T. Effects of genotype and diet on age-related lesions in ad libitum fed and calorie-restricted F-344, BN, and BNF3F1 rats. *Journal of Gerontology* 1999; 54A(11): B478–91
- Lipp H.-P., Pleskacheva M.G., Gossweiler H., Ricceri L., Smirnova A.A., Garin N.N., Perepiolkina O.P., Voronkov D.N., Kuptsov P.A., Dell’Omo G. A large outdoor radial maze for comparative studies in birds and mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 83-99
- Loidl F.C., Gavilanes D.A.W., Van Dijk E.H.J., Vreuls W., Blokland A., Vles J.S.H., Steinbusch H.W.M., Blanco C.E. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiology & Behavior* 2000; 68: 263–269

- Lu L., Bao G., Chen H., Xia P., Fan X., Zhang J., Pei G., Maa L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Experimental Neurology* 2003; 183: 600–609
- Luine V.N., Martinez C., Villegas M., Magarinos A.M., McEwen B.S. Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology & Behavior* 1996; 59: 27–32
- Lukoyanov N.V., Sá M.J., Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M. Selective loss of hilar neurons and impairment of initial learning in rats after repeated administration of electroconvulsive shock seizures. *Exp. Brain Research* 2004; 154: 192–200
- Mattson M.P., Duan W., Guo Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Neurochemistry* 2003; 84: 417–431
- Mauderli A.P., Acosta-Rua A., Vierck Ch.J. An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 97: 19–29
- McEwen B.S., Sapolsky R.M. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 1995; 5: 205-216
- McLay R.N., Freeman S.M., Zadina J.E. Chronic corticosteron impairs memory performance in the Barnes maze. *Physiology and Behavior* 1998; 63(5): 933-937
- Meek L.R., Burda K.M., Paster E. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiology & Behavior* 2000; 71: 543-549
- Morris R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 1981; 12: 239-260
- Mostafaa R.M., Mostafab Y.M., Ennaceur A. Effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field of 2 G intensity on memory and corticosterone level in rats. *Physiology & Behavior* 2002; 76: 589– 595
- Myhrer T. Adverse psychological impact, glutamatergic dysfunction, and risk factors for Alzheimer’s disease. *Neuroscience Biobehavioral Review* 1998; 23:131–139
- Nicholas A., Munhoz C.D., Ferguson D., Campbell L., Sapolsky R. Enhancing cognition after stress with gene therapy. *The Journal of Neuroscience*, 2006; 26(45): 11637–11643
- Palchykova S., Crestani F., Meerlo P., Tobler I. Sleep deprivation and daily torpor impair object recognition in Djungarian hamsters. *Physiology & Behavior* 2006; 87: 144–153
- Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El-Bahr S.M. Möstl E. Stress hormones in mammals and birds. Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1040: 1–10

- Pardon M.-Ch., Kendall D.A., Pérez-Díaz F., Duxon M.S., Marsden Ch.A. Repeated sensory contact with aggressive mice rapidly leads to an anticipatory increase in core body temperature and physical activity that precedes the onset of aversive responding. *European Journal of Neuroscience* 2004; 20: 1033–1050
- Pham K., Nacher J., Hof P.R., McEwen B.S. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus *European Journal of Neuroscience* 2003; 17: 879–886
- Pryce C.R., Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2003; 27: 57–71
- Radecki D.T., Brown L.M., Martinez J., Teyler T.J. BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippocampus* 2005; 15: 246-253
- Roberge M.-C., Messier C., Staines W.A., Plamondon H. Food restriction induces long-lasting recovery of spatial memory deficits following global ischemia in delayed matching and non-matching-to-sample radial arm maze tasks. *Neuroscience* 2008; 156: 11–29
- Roosendaal B., Griffith Q.K., Buranday J., de Quervain D. J.-F., McGaugh J.L. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. *Proceeding Natl. Academy Science* 2003; 100: 1328-1333
- Sakai M., Kudoh M., Shibuki K. Long-lasting enhancement of sound discrimination ability after sound exposure in rats. *Neuroscience Research* 1999; 33: 87-97
- Sandi C., Loscertales M., Guaza C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience* 1997; 9: 637-642
- Sandi C., Woodson J.C., Haynes V.F., Park C.R., Touyarot K., Lopez-Fernandez M.A., Venero C., Diamond D.M. Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 2005; 57: 856–864
- Sapolsky R.M. Do the salutary effects of food restriction occur because of or despite of the accompanying hyperadrenocorticism? *Neurobiology Aging* 1995; 16(5): 849–50.
- Schellinck H.M., Stanford L., Darrah M. Repetitive acute pain in infancy increases anxiety but does not alter spatial learning ability in juvenile mice. *Behavioural Brain Research* 2003; 142: 157–165

- Sherwood L., Klandorf H., Yancey P.H. (2005): *Animal Physiology – from genes to organisms*. Thomson Brooks/Cole, Belmont. 284-291
- Shors T.J., Beylin A.V., Wood G.E., Gould E. The modulation of Pavlovian memory. *Behavioural Brain Research* 2000; 110: 39-52
- Shors T.J. Learning during stressful times. *Learning and Memory* (2004); 11:137-144
- Smith C., Gisquet-Verrier P. Paradoxical sleep deprivation and sleep recording following training in a brightness discrimination avoidance task in Sprague–Dawley rats: Paradoxical effects. *Neurobiology of Learning and Memory* 1996; 66: 283-294
- Smith C.T., Conway J.M., Rose G.M. Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task. *Neurobiology of Learning and Memory* 1998; 69: 211-217
- Sousa N., Lukoyanov N.V., Madeira M.D., Almedia O.F.X., Paula-Barbosa M.M. Reorganization of the morphology of the hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 2000; 97: 253-266
- Szurana T.F., Plisĭkaa V., Pokornya J., Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & Behavior* 2000; 71: 353-362
- Touyarot K., Venero C., Sandi C. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 290–305
- Veselovský Z. (2005): *Etologie – biologie chování zvířat*. Academia, Praha. 165-169, 183-184
- Welberg L.A.M., Seckl J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal of Neuroendocrinology* 2001; 13: 113-128
- Woodson J.C., Macintosh D., Fleshner M., Diamond D.M. Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learning and Memory* 2003; 10: 326–336
- Wright R.L., Lightner E.N., Harman J.S., Meijer O.C., Conrad D. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *European Journal of Neuroscience* 2006; 24: 595–605
- Xiong W., Yang Y., Cao J., Wei H., Liang Ch., Yang S., Xu L. The stress experience dependent long-term depression disassociated with stress effect on spatial memory task. *Neuroscience Research* 2003; 46: 415-421

- Yanai S., Okaichi Y., Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiology Aging* 2004; 25: 325–32
- Yang M., Augustsson H., Markham C.M., Hubbard D.T., Webster D., Wall P.M., Blanchard R.J., Blanchard D.C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & Behavior* 2004; 81: 465–473
- Yang J., Han H., Cao J., Li L., Xu L. Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. *Hippocampus* 2006; 16: 431-436
- Youngblood B.D., Zhou J., Smagin G.N., Ryan D.H., Harris R.B.S. Sleep deprivation by the “Flower Pot” technique and spatial reference memory. *Physiology & Behavior* 1997; 61(2): 249-256