

Tartu Ülikool
Psühholoogia Instituut

Lisanna Pertens

**EMAROTTIDE VANEMLIKU KÄITUMISE SEOSSED ÄREVUSE JA
POEGADE POSITIIVSET AFEKTIIVSUST VÄLJENDAVATE
HÄÄLITSUSTEGA**

Seminaritöö

Juhendajad: prof Jaanus Harro

Kadri Kõiv, PhD

Läbiv pealkiri: Emahoole seosed ärevuse ja poegade afektiivsusega

Tartu 2014

Kokkuvõte

Emasrottide vanemliku käitumise seosed ärevuse ja poegade positiivset afektiivsust väljendavate hääliitsustega

Rotipoegade areng sõltub sünnijärgsetel nädalatel suurel määral emahoole hulgast ja kvaliteedist. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida ärevust kui loomulikult esinevat emahoole variatiivsust mõjutavat tegurit ja kontrollida, kas erinevused emade (n=16) vanemlikus käitumises ennustavad poegade indiviidiomast positiivset afektiivsust. Ärevust mõõdeti plusspuuri testiga kahel korral: enne loomade paaritamist ja pärast poegadest võõrutamist, mis võimaldas kontrollida emadusega kaasnevaid muutusi ärevuse tasemes. Emahoolt hinnati pesakondade vaatluste teel. Poegade positiivset afektiivsust mõõdeti 50 kHz hääliitsuste järgi noorloomade omavahelist mängu imiteerival stimulatsioonil (kõdistamisel).

Teistkordsel mõõtmisel oli rottidel kalduvus käituda vähem ärevalt, kuid seda ei saanud siduda otseselt emaks saamise kogemusega. Leiti, et ärevus on oluline emahoolt mõjutav tegur ja kõrgem emahoole kvaliteet on seotud madalama ärevusega. Parem emahool ennustas ka suuremat positiivse afektiivsuse hääliitsuste arvu poegadel ning väiksemat 22 kHz stressihääliitsuste arvu.

Abstract

Maternal behavior of the rat: relationships with anxiety of dams and positive affect of offspring

The development of rat pups is dependent upon the amount and quality of maternal care received during the first postnatal weeks. The current study aims to investigate the role of trait anxiety in modulating variation in maternal care and the possibility to predict the individual positive affect of offspring based on differences in behavior of mothers (n=16). Anxiety was measured using the elevated plus maze on two occasions: before mating and after pup weaning, which enabled to test for changes due to motherhood. Maternal care was assessed by observation of litters. Positive affect of offspring was measured by counting 50 kHz calls emitted during tickling – a stimulation which mimics the play of young rats.

There was a tendency for reduced anxiety during the second plus maze test. However, this could not be directly linked to motherhood. Anxiety proved to have a significant influence on maternal care as better care was linked to lower anxiety. Better maternal care also predicted a higher amount of 50 kHz calls and a reduced amount of 22 kHz stress calls.

Sissejuhatus

Emahoole kvaliteedi hindamine

Emahoole hulk ja kvaliteet on rotipoegade esimestel elunädalatel eriti oluline. Pojad on sündides abitud ja nende ellujäämine ning areng sõltuvad suurel määral emast. Üheks tähtsaks emahoole funktsiooniks on kaitsta arenevat aju stressi kahjuliku mõju eest. Emapoolne taktiline stimulatsioon ja toitmine hoiavad poegadel alal stressile hüporesponsiivset perioodi, mis tähendab, et nende neerupealiste reageerivus stressile on madal ja hoitakse minimaalsena glükokortikoidide vabanemist, mis võivad omada aju arengule kahjulikke efekte (Levine, 2001). Emahoole mõju arengule väljendub ka palju emahoolt kogenud täiskasvanud poegade väiksemas uudsehirmus ja neuraalsetes erinevustes, mis viitavad kõrgemale stressitaluvusele (Caldji jt 1998).

Emahoole põhilised komponendid on imetamine ja poegade lakkumine või sugemine. Eristada saab kolme põhilist imetamisstiili: kumera seljaga imetamine (*arched back nursing*), poegi kattev imetamine (*blanket nursing*) ja passiivne imetamine (*passive nursing*), kus ema lamab küljel või selili (Myers, Brunelli, Squire, Shindeldecker ja Hofer, 1989). Ainsaks aktiivseks imetamisasendiks peetakse neist esimest, kus ema seisab väljasirutatud jalgadega liikumatus küürus olekus ja on täielikult poegadele pühendunud (Stern ja Johnson, 1990; Bosch, 2011). Suurima panustatud energia tõttu on just kumera seljaga imetamise esinemissagedus hea emahoole kvaliteedi indikaator.

Teiseks hinnatakse emahoolt poegade lakkumise ja sugemise hulga järgi, mis hõlmab nii keha kui ka anogenitaalpiirkonna lakkumist. Champagne, Francis, Mar ja Meaney (2003) tähtsustavad just lakkumist ja sugemist poegade endokriinse, emotsionaalse ja kognitiivse stressivastuse arengus. Anogenitaalne lakkumine soodustab ka noorte rotipoegade regulaarset uriinieritamist (Moore, 1992).

Kuigi mitmetes töödes on leitud lakkumise ja sugemise ning kumera seljaga imetamise tihedat koosinemist ja head korreleeruvust (Weaver, Meaney ja Szyf, 2006; Champagne jt, 2003), ei ole tõestust, et üks kahest oleks emahoole hindamiseks õigem. Tuleb arvestada, et tegu on üksteist täiendavate emahoole kvaliteedi indikaatoritega – seetõttu on ka levinud lähenemine hinnata neid mõlemaid koos. Veel mõned näitajad, mida emahoole headuse hindamiseks kasutatakse, on kui tihti ema pesast väljarännanud poegi sinna tagasi kannab, kui suure osa ajast ema poegadega füüsilises kontaktis viibib (lakub ja sugeb, imetab) ning kui suure osa ajast üldse poegadega seotud tegevustele pühendab (eelmainitule lisaks pesa ehitamine ja poegade pesamaterjaliga katmine) (Bosch, Pfortsch, Beiderbeck, Landgraf ja Neumann,

2010). Samuti on kasutatud emahoole hindamiseks poegade äratoomise katset, kus pojad on võõra puuri eri nurkadesse paigutatud ning edasiarendatud variandi puhul peab ema läbima poegadeni jõudmiseks ka mõned ebameeldivad takistused (Neumann, Krömer ja Bosch, 2005).

Ärevuse mõõtmine plusspuuri testiga

Plusspuuri test on laialt levinud meetod näriliste ärevuse mõõtmiseks, mille kasutamine sai alguse Handley ja Mithani (1984) ning Pellow, Chopini, File'i ja Briley (1985) töödega. Katseseadmeks on maapinnast kõrgemale asetatud plussikujuline puur, mille kaks vastashaara on seintega ümbritsetud (tume ala) ning teised kaks haara on ilma seinteta (avatud ala). Puur on pealt avatud. Looma liikumise täpsemaks hindamiseks võivad puuri põrandale olla kantud jooned, mis eraldavad tsentriala haaradest ja jagavad avatud haarad osadeks. Katse alguses asetatakse rott puuri keskele ning registreeritakse piiratud aja jooksul tema tegevus tsentris ja avatud haarades.

Katse loob konflikti kahe roti jaoks loomuliku käitumisviisi vahel: uute kohtade avastamishuvi ja potentsiaalselt ohtlike alade vältimine (Rodgers ja Dalvi, 1997; viidanud Sidor, Rilett ja Foster, 2010). Avatud haarade kui potentsiaalselt ohtlike alade uudistamise määr on seotud roti ärevuse tasemega. Seda tõestab näiteks ärevust modifitseerivate farmakoloogiliste ainete mõju avatud haaradesse sisenemistele ja seal viibitud ajale. Pellow jt (1985) näitasid, et anksiolüütilised (e. ärevust alandavad) ained tõstavad avatud haaradesse sisenemiste arvu ja seal viibitud aega, samas kui anksiogeensed ained langetavad seda.

Kuna käesolevas uuringus kasutati plusspuuri testi kahel korral, puutume kokku teistkordsest testimisest tingitud käitumise muutumise probleemiga, mida peab arvestama tulemuste tõlgendamisel. Nimelt on mitmed hiljutised uurimused leidnud, et teisel plusspuuri testil kalduvad rotid madalamale aktiivsusele avatud osas (ülevaade Walf ja Frye, 2007). Selle põhjuseks peetakse testi tuttavusest tulenevat alanenud uudishimu, mistõttu konflikti ohtlike alade vältimise ja uue avastamishuvi vahel enam samaväärsel määral ei teki (Bertoglio ja Carobrez, 2000; Roy, Chapillon, Jeljeli, Caston ja Belzung, 2009).

Efekti on aga võimalik vältida, jättes testimiskordade vahele piisavalt pika aja. Näiteks Adamec ja Shallow (2000) ning Adamec, Shallow ja Burton (2005) on leidnud, et korrates katset vähemalt kolm nädalat hiljem ning vahetades testimisruumi, ei vähenenud rottide avatud osas viibitud aeg. Ka Neumann jt, (2005a), kes viisid katsed läbi 10-nädalaste paaritamata rottidega ja seejärel 8 nädalat hiljem, pärast nende poegimist, leidsid, et

erinevused kõrge ja madala ärevusega rottide gruppide vahel olid säilinud. Kuna aga tegemist oli ärevuse järgi aretatud rottidega, on need tulemused tugevasti pärilikkusest mõjutatud.

Ärevus ja emadus

Emaks saamine toob roti jaoks endaga kaasa nii füsioloogilised kui keskkondlikud muutused, millega kaasnevad ka paaritamata emastest erinevad käitumisreaktsioonid. Ärevuse ja emaduse seosele saab mitmeti läheneda. Ühest küljest näib, et emaroll mõjub rottidele ärevust vähendavalt. Rotiemade ärevust vähendab poegade juuresolek, mis võib reguleerida tähelepanu pööramist ärevatele stiimulitele. Nii on leitud, et pesakonna juuresolekul esineb emadel vähem ärevuselaadset käitumist avatud välja testis ning vähem tarduvat käitumist ehmatava hääle peale (Ferreira, Hansen, Nielsen, Archer ja Minor, 1989; Hard ja Hansen, 1985; mõlemaid viidanud Ruthschilling jt, 2012). Samas on katsed näidanud, et lakteerivad rotiemad on paaritamata emasrottidest vähem ärevad ka plusspuuri testis, kus nad poegadega kokku ei puutu (ülevaade Lonstein, 2007). See annab alust oletada, et poeginud rottide ajus on toimunud püsivamaid muutusi, mida kinnitavad Wartella jt (2003) katsete tulemused, kus tiinuse-, poegimise- ja laktatsioonikogemusega rottidel esines vähem ärevuselaadset käitumist avatud välja testis ning oli nõrgem stressiga seotud neuraalne aktivatsioon hippokampuses ja mandelkehas kui paaritamata emastel.

Madal ärevus ja hoolitsuskäitumine esinevad tihti koos. Imetavate rotiemade ärevus on paaritamata emastest madalam ning kui poeginud emasrotid hakkavad hoolitsema nende juurde asetatud omade või võõraste poegade eest juba esimesel kokkupuutel, siis mittelakteerivatel täiskasvanud emastel esineb rotipoegade suhtes loomulik vältimisreaktsioon ja isegi vaenulikkus, mis on seotud rottide üldise hirmuga uudsuse suhtes (Champagne, Diorio, Sharma ja Meaney, 2001; Numan ja Stolzenberg, 2008). Sellega kooskõlas on tulemused, et hoolsamatel emadel, kes poegi palju lakuvad, sugevad ja kumera seljaga imetavad, on vähem hoolsatega emadega võrreldes madalam uudsusehirm (Francis, Champagne ja Meaney, 2000).

Samas on aretamiskatsed leidnud, et just kõrge ärevus on head emahoole kvaliteeti ennustav tegur. Seda nii imetamisstiile kui poegadega kontaktis veedetud aega hinnates. Boschi ja Neumanni töödes on leitud katsetes selektiivselt kõrge ärevuse järgi paljundatud rottide puhul sagedasemat kumera seljaga imetamist (eriti hommikusel ajal) (Bosch, Krömer ja Neumann 2006; Bosch ja Neumann, 2008). Sama seost on näidatud ka hiirte puhul: madala ärevuse järgi paljundatud liinil esines vähem emakäitumist, sealhulgas nii vähem kumera seljaga imetamist kui ka üldist poegadega tegelemist (Kessler, Bosch, Bunck, Landgraf ja Neumann, 2011).

Lisaks eristab kõrge ärevuse järgi paljundatud rotte madala ärevusega rottidest suurem imetamisele kulutatud aeg kokku (Bosch, 2011). Neumanni jt (2005a) katses kõrge ja madala ärevusega loomad küll kumera seljaga imetamises ja lakkumises ning sugemises ei erinenud, kuid ärevamad veetsid rohkem aega poegadega kontaktis ja viibisid vähem pesast eemal.

Erinevusi on leitud ka teist tüüpi emakäitumistes: poegade äratoomise katses tõid kõrge ärevuse järgi paljundatud rottiliini emad pojad kiiremini ära ning emaagressiivsuse e. poegade kaitse testis käitusid nad sissetungija suhtes agressiivsemalt (Neumann jt, 2005a).

Katsed emade ja paaritamata emaste võrdluses viitavad sellele, et hea hoolitsuskäitumise tekkeks on kohane madalam ärevus ning seetõttu peaks emaks saamine ärevust alandama. Aretusuuringud jällegi on leidnud korrelatsiooni hea emahoole ja kõrgema ärevuse vahel. Käesolevas töös on üritatud küsimuses selgust luua, mõõtes samade rottide ärevust enne paaritamist ja pärast poegade sündi ning võrreldes ärevamate ja vähem ärevate rottide emahoolt, et uurida, milline seos ärevuse ja emahoole kvaliteedi vahel eksisteerib selliste rottide grupis, keda spetsiaalselt ärevuse järgi aretatud ei ole.

Rottide afektiivust väljendavad ultrahelihäälitsused

Rottidel on kaks põhilist tüüpi ultrahelihäälitsusi, mis esindavad erinevaid emotsionaalseid seisundeid. Madalad, umbes 22 kHz sagedusega häälitsused, mida arvatakse väljendavat stressi ja negatiivset afektiivust (Knutson, Burgdorf ja Panksepp, 2002), esinevad näiteks kiskjatega kokkupuutel, sotsiaalse alistatuse järel, ehmatavale häälele eksponeerimisel ning kohati ka looma käsitlemisel (*handling*) ja puudutamisel (Wöhr ja Schwarting, 2008).

Kõrgeid, umbes 50 kHz häälitsusi, peetakse mängulusti ja üldist positiivset afektiivsust väljendavaks (Burgdorf, Panksepp, Brudzynski, Kroes, Moskal, 2005). Nii häälitsevad rotid seoses erinevate naudinguliste tegevustega: omavahelisel mängul, (Willey, Varlinskaya ja Spear, 2009), seksuaalkäitumise ajal (Bialy, Rydz ja Kaczmarek, 2000) ning teatud narkootiliste ainete ootuses ja manustamisel (Maier, Ahrens, Ma, Schallert ja Duvauchelle, 2010).

50 kHz häälitsusi, mis on omased noorloomade omavahelisele mängule, on võimalik esile kutsuda ka eksperimentaalselt – kōdistades looma viisil, mis seda mängu matkib (Burgdorf jt, 2005). Häälitsused sarnanevad mõneti inimeste rõõmuväljendusega: ka laste müramismänge saadab sageli naer, mis pole nii väga huumorist tingitud, kui väljendab laste üldist mängulusti ja sotsiaalsust (Siviy ja Panksepp, 2011). Teiseks elunädalaks kujuneb rottidel välja individuaalne ja püsiv vastus kōdistamisele, mille alusel on võimalik rottide positiivset

afektiivsust hinnata, jagades neid produtseeritud 50 kHz hääliksuste arvu järgi (Mällo jt, 2007).

Stressil on 50 kHz hääliksustele pidurdav mõju: eksponeerides loomi enne kõdistamist stressile, on nende 50 kHz hääliksuste arv väiksem (Popik, Potasiewicz, Pluta ja Zieniewicz, 2012). Samuti on normaalolekus produtseeritud 50 kHz hääliksuste arv hea stressitaluvuse indikaator. Võrreldes vähe ja palju 50 kHz hääliksusi tegevate rottide käitumisvastuseid kroonilisele varieeruvale stressile, on isaste rottide hulgas leitud vähehääliksivate isendite puhul käitumuslikke ja füsioloogilisi märke suuremast negatiivsest afektist: vähene kaalus juurdevõtmine, madalam sukroosieelistus ja enam liikumatust sunnitud ujumise testis, samuti kõrgem oksüdatiivne metabolism negatiivsete emotsioonidega seotud ajupiirkondades ning kõrgem kortikosterooni tase täisveres (Mällo, Matrov, Kõiv ja Harro, 2009; Raudkivi, Mällo ja Harro, 2012).

Kõdistamisel toovad rotid teatud määral kuuldavale ka 22 kHz hääliksusi, kuid seni pole jõutud konsensussele nende põhjuse osas. Üheks 22 kHz hääliksusi soodustavaks olukorraks on täiskasvanud roti jaoks tundmatu inimese poolt algatatud dorsaalne kontakt (Brudzynsky ja Ociepa, 1992, viidanud Knutson jt, 2002), kuid selleks näeb kõdistamise protseduur ette rottide harjutamist eksperimentaatori ja tema tegevusega. Samuti on mitmetes katsetes leitud, et kõdistamisega harjutamise tulemusena mingit süstemaatilist muutust 22 kHz hääliksuste arvus ei ilmnenu (Panksepp ja Burgdorf, 1999; Mällo jt, 2007).

Võimalik, et eri tüüpi hääliksused peegeldavad kõdistamisel tekkivaid vastandlikke tundeelamusi. On leitud 22 ja 50 kHz hääliksuste negatiivset korreleeruvust kõdistamisel ning suure hulga 50 kHz hääliksuste järgi paljundatud rotiliinil juhusliku liiniga võrreldes vähem 22 kHz hääliksusi (Knutson jt, 2002; Burgdorf jt, 2005). Seldeni (2004) järgi sisaldab reaktsioon kõdistamisele lisaks naudingule ka alistatuse signaale (viidanud Mällo jt, 2007). Võttes ka arvesse, et 22 kHz hääliksusi toovad rotid kuuldavale pigem potentsiaalse ohu kui otseselt ohtliku situatsiooni puhul, võib nende funktsiooniks olla märguandmine, et teatud stimulatsiooni jätkumisel võib kõdistamine muutuda ebameeldivaks kogemuseks (Brudzynski ja Ociepa, 1992; viidanud Mällo jt, 2007).

Ka rottide ärevus võib 22 kHz hääliksuste esinemist mõjutada. Borta, Wöhr ja Schwarting (2006) on leidnud, et plusspuuris kõrgema ärevusetasemega rottidel on hirmutekitavas olukorras rohkem 22 kHz hääliksusi. Võimalik, et rohkem 22 kHz hääliksusi kuuldavale toovad rotid on ärevuse tõttu tundlikumad kõdistamisel tahtmatult ettetulevatele ebamugavustele.

Ultrahelihäälitsused ja emakäitumine

4-16 päeva vanustel rotipoegadel, kellel pole veel välja kujunenud 22 ja 50 kHz häälitsusi, domineerivad teistsugused, mitmeid sagedusi läbivad ja keskmiselt umbes 40-kHz sagedusega häälitsused (Noirot, 1968; viidanud Knutson jt, 2002). Ultrahelihäälitsusi kasutavad pojad emaga suhtlemiseks. Rotipojad hakkavad häälitsema distressiolukorras ja kohe kui nad on emast ja ülejäänud pesakonnast eraldatud (Miczek, Tornatzky ja Vivian, 1991; viidanud Knutson jt, 2002). Ultrahelihäälitsused kutsuvad emas esile hoolitsuskäitumiste kasvu: ema hakkab rohkem poegadele tähelepanu pöörama või neid otsima ja vajadusel pesasse tagasi kandma (ülevaade Branchi, Santucci ja Alleva, 2001 artiklis). Samuti põhjustavad häälitsused emapoolse anogenitaalse lakkumise sagenemist (Brouette-Lahlou, Vernet-Maury ja Vigouroux, 1992).

Teistpidi, häälitsused jällegi sõltuvad otseselt emalt saadud tagasisidest. Pojad häälitsevad rohkem, kui ema nendega kontakti asub: pessa sisenemisel, seal liigutamisel või poegade lakkumisel (Ihnat, White ja Barfield, 1995). Kui aga häälitsustele reaktsiooni ei järgne, näiteks kui poegi kasvatab kurt ema, siis häälitsuste arv väheneb (D'Amato ja Populin, 1987; viidanud D'Amato, Scalera, Sarli ja Moles, 2005).

Kuna emahool avaldab mõju poegade häälitsusaktiivsusele, on võimalik, et see mõjutab natuke hiljem ka noorloomade 50 ja 22 kHz sagedusega häälitsuste arvu. Rotipoegade ja täiskasvanud rottide ultrahelihäälitsusi juhivad samad kesksed ajuosad ning põhiliselt samad neurotransmitterisüsteemid, mis viitab arengulisele seosele nende vahel (Brunelli, 2005). 40 kHz häälitsuste kohta on leitud, et need ennustavad täiskasvanuea kartlikkust ja stressile reageerivust (Dichter, Brunelli ja Hofer, 1996; viidanud Knutson jt, 2002).

Kuigi tundub, et emakäitumise rolli 50 kHz häälitsuste arvukuse kujunemises pole eriti uuritud, on teada mitmeid seoseid emakäitumise ja järglaste emotsionaalsuse vahel, millest on võimalik luua hüpoteese ka emahoole rolli kohta kõdistamisele reageerivuses. Leitud on, et vähe lakkuvate ja sugevate ning kumera seljaga imetavate emade pojad on stressile vastuvõtlikumad ning kartlikumad uudsuse suhtes (Caldji, Diorio ja Meaney, 2000). Samuti tõstab vähene kontaktaeg emaga järglaste ärevust täiskasvanueas. Seda ka siis, kui poegade genotüüp on väheärev – seega on tähtis just emahool ise (Neumann jt, 2005b).

Leitud on ka kvaliteetse emahoole seos paremini stressi taluva fenotüübi esinemisega täiskasvanud poegadel (Liu jt, 1997). Nagu eelpool mainitud, on paremini stressi taluvad ka palju 50 kHz häälitsusi tegevad rotid. Seetõttu uuritigi käesolevas töös, kas kvaliteetsem emahool seostub poegadel kõdistamise ajal suurema hulga 50 kHz häälitsuste ja väiksema hulga 22 kHz häälitsustega.

Töö eesmärk ja hüpoteesid

Antud töö eesmärgiks on uurida rottide emahoole kvaliteeti ennustavaid tegureid, võrreldes palju ja vähe hoolitsuskäitumisega tegelevaid emasid ärevuse tasemelt. Samuti on töö eesmärgiks teada saada, kas varajases nooruses kogetud emahoole hulk ja kvaliteet seondub hilisemas eas poegade positiivse afektiivsuse häälitsustega kõdistamisel. Töö hüpoteesid on:

1. Emaks saamise järel käituvad rotid plusspuuris vähem ärevalt.
2. Hoolitsuskäitumise kvaliteet sõltub rotiemade plusspuuris mõõdetud ärevuse tasemest.
3. Kõrgem emahoole kvaliteet seostub poegadel kõdistamisel mõõdetud suurema 50 kHz häälitsuste arvuga.

Meetod

Katseloomad ja majutus

Katseloomadeks oli 20 emast täiskasvanud Wistari liini rott (Harlan Laboratories, Holland). Lõplikku analüüsi jäi 16 rott, kuna vaid nende kohta oli võimalik koguda emakäitumise andmeid. Loomi peeti kuni paaritamiseni neljakaupa ja pärast seda üksikult standardsetes pleksiklaasist puurides Psühhofüsioloogia ja funktsionaalse morfoloogia vivaariumis. Pärast poegadest võõrutamist paigutati rotid jälle grupimajutusse. Loomadel oli pidevalt vaba juurdepääs toidule ja veele. Rotiruum oli automaatse valgusrežiimiga: tuled põlesid kella 8:00-st 20:00-ni. Kontrollitud õhuniiskustasemega ruumis oli temperatuur 20-24 kraadi vahemikus. Eksperimendid olid kooskõlas Euroopa Liidu seadusandlusega (direktiiv 2010/63/EU).

Üldine katse käik

Kõigepealt mõõdeti emasrottide ärevust plusspuuris. Seejärel loomad paaritati ning hinnati pesakondade vaatluste abil emakäitumist. Kolme nädala vanuselt pojad võõrutati ja rotimadega tehti läbi teine ärevustest. Poegadel mõõdeti reageerivust noorloomade mängu imiteerivale stimulatsioonile. Pärast viimast plusspuuri testi emaloomad hukati.

Plusspuuri test

Esimese etapina katses mõõdeti rottide ärevuse taset. Selleks kasutati plusspuuri testi, mis põhineb Handley ja Mithani (1984) poolt esmakirjeldatud meetodil. Katseseadmeks oli plussikujuline puur, mille kaks vastastikku asetsevat seintega ümbritsetud haara moodustasid suletud osa ja teised kaks, ilma seinteta haara moodustasid koos tsentripiirkonnaga avatud osa. Haarade mõõtmed olid 40x10 cm². Tsentriosa oli mõõtmetega 10x10 cm². Seinte kõrgus oli 40 cm. Puuri põrandale olid kantud jooned, mis eraldasid tsentriala haaradest ja jagasid avatud haarad kolmeks võrdseks osaks.

Rott asetati peaga suletud haara suunas ning tema käitumine skooriti kahe eksperimentaatori poolt viie minuti jooksul. Näitajad, mida mõõdeti, olid järgmised: avatud haaradesse sisenemiste arv, suletud haaradesse sisenemiste arv, latents tsentrisse sisenemisel, latents avatud haara sisenemisel, aeg tsentris, aeg avatud osas, jooneületuste arv tumeda ala ja tsentri vahel, jooneületuste arv avatud osas, suletud osast nina tsentrisse panemine ja *stretched attend posture* e. SAP (spetsiifiline riskihindamist väljendav „väljavenitatud“ kehahoid, kus loom sirutab end ainult korraks avatud osasse, et otsustada, kas läheneda või eemalduda). Samuti

loeti nii tsentri kui avatud osa kohta üle, mitu korda esines tagakäppadele tõuse ja *head dip*'e (riskihindamist väljendav pealangetus puuripinnast madalamale).

Teistkordne plusspuuri test viidi läbi 13-16 päeva pärast võõrutust ehk 11 nädalat pärast esimest plusspuuri testi, rottide käitumine filmiti üles ning skooriti pärast videost. Emaloomad hukati 4 päeva pärast viimast plusspuuri testi ajude analüüsimiseks.

Emakäitumise hindamine

Pärast plusspuuri testi loomad paaritati. Lõpliku vaatluse alla võeti 16 rott. Pojad (n=170) sündisid orienteeruvalt kolm nädalat pärast paaritamist. Rotiemad elasid kogu tiinuse aja ühekaupa pleksiklaasist puurides, pesakonna suurus oli 4-14 poega, keskmiselt $10 \pm 2,3$.

Puuripõhi oli kaetud saepuruga, mida rotiemad said kasutada pesa ehitamiseks. Täiendavat pesamaterjali oli neile antud minimaalselt, et see ei häiriks vaatlusi. Puurid asetsesid puuririiulites, kolm puuri üksteise kohal. Iga puuri kohal oli vaatluste hõlbustamiseks ühe puuri jagu tühja ruumi. Puuride valgustatus oli kontrollitud.

Rotiemade vaatlemisel kasutati minimaalsete muudatustega Champagne'i, jt 2003. aasta artiklis kirjeldatud meetodit, mis omakorda põhineb Myersi jt (1989) meetodil. Vaatlusi hakati teostama alates teisest sünnijärgsest päevast (PND 2: *post-natal day* 2), lugedes PND 0 sündimise päevaks, ning need kestsid kaheksanda sünnijärgse päevani (PND 8, k.a). Kui pojad olid sündinud öö jooksul, arvestati nad pärast südaööd sündinuks.

Vaatlused toimusid viis korda päevas: kell 6:00, 10:00, 13:00, 17:00 ja 21:00. Hommikul esimene ja õhtul viimane vaatlus toimusid pimedate perioodi ajal. Siis kasutati rottide vaatlemiseks punase valgusega pealampi (valgusvoo tugevus mitte rohkem kui 5 luks). Ühe vaatlustsükli jooksul vaadati iga rotie kohta kokku 25 korda: iga 3 minuti järel fikseeriti aegväljavõtteliselt ema tegevus. Kokku tuli iga rotie kohta 875 vaatluskorda. Aega mõõdeti stopperiga. Vaatleja sisenes alati rotiruumi 5 minutit enne vaatlustsükli algust, et rotid jõuaksid olukorraga kohaneda. Pimedate perioodi vaatluste puhul viidi selle aja jooksul läbi ka rottide punasele valgusele eksponeerimine.

Vaatlejad olid kaks, mistõttu viidi läbi ka nendevahelise reliaabluse mõõtmised, kus mõlemad vaatlejad täitsid samaaegselt, kuid iseseisvalt oma vaatluslehti. Kaks ühist vaatlust toimusid valgus perioodil (10:00 ja 13:00) ning üks pimedal (21:00). Vaatlejatevaheline korrelatsioon oli üle kolme vaatluskorra vastavalt vaadeldavale käitumisele vahemikus 0,81 ja 0,99.

Tegevused, mida emade juures hinnati olid järgmised: 1) lakub/sugeb poegi (*licking/grooming pups*), 2) imetab kumera seljaga (*arched back nursing*), 3) imetab poegi kattes (*blanket nursing*), 4) imetab passiivselt (*passive nursing*), 5) ehitab pesa/katab poegi (*nesting /*

covering pups), 6) peseb ennast (*self-grooming*), 7) poegadest eemal (*off pups*), 8) poegadest eemal ning seejuures passiivne (*off pups passive*). Lisaks registreeriti, kui üksikud pojad olid emast eemal pesast väljas ja märgiti üles nende arv. Kategooriad ei olnud üksteist välistavad. Olukordades, kus imetamisasend ei olnud selgelt väljendunud, lähtuti sellest, kui palju vaeva ema näeb, et imetamisasendit hoida, kusjuures kumera seljaga imetamine väljendas maksimaalset pingutust ja passiivne imetamine minimaalset.

Käitumisvaatlused toimusid minimaalselt teisest kaheksanda sünnijärgse päevani, kuid varem poeginud emade kohta koguti andmeid kauem. Pojad võõrutati kolme nädala vanusena ja paigutati pärast kaalumist ja soo määramist ühekaupa puuridesse. Emaseid ja isaseid oli vastavalt 86 ja 84.

Poegade kōdistamine

Kohe pärast võõrutamist (PND 21) alustati poegade kōdistamisega. Iga looma kōdisessioon kestis 2 minutit päevas 14 päeva jooksul. Protseduur nägi isaste rottide puhul välja järgmine. Rott toodi kodupuuris katseruumi, kus ta tõsteti poolläbipaistvasse heledasse plastikkasti (30×15×13 cm), kus toimus kōdistamine. Stopperi käimapanekule järgnes 15 sekundit kohanemisaega, seejärel 15 sekundit kōdistamist. Looma kōdistati turjalt, koonu ja kõhu alt ning iga tsükli viimase 3 sekundi jooksul keerati loom selili viisil, mis matkib loomade omavahelises mängus esinevat selilipanekut ehk *pin*'i. Sellele järgnes 15 sekundit pausi ja 15 sekundit kōdistamist ning nii kuni 2 minuti täitumiseni. Pärast seda transporditi loom oma puuris tagasi hoiuruumi ning katsekast puhastati vee ja pabersalvrätiga.

Loomade häälsused registreeriti ultrahelimikrofoni (Avisoft Ultra Sound Gate 116-200, Avisoft Bioacoustics, Berliin, Saksamaa) ja arvutiprogrammi Avisoft abil. Andmed salvestati 12-14 kōdistamispäeva kohta, kuna selleks ajaks peaks loomadel olema kujunenud välja indiviidiomane püsiv häälsuste arv (Mällo jt, 2007).

Emaste rotipoegade puhul nägi protseduur välja sarnane, ainult selle erinevusega, et 1-11 päeval kōdistati kahte looma paralleelselt, nii et eksperimentaator kasutas kōdistamiseks mõlemat kätt. Loomad olid terve katse aja seinaga eraldatud, nii et nad ei puutunud üksteisega kokku ega kuulnud kōdistamise ajal üksteise häälsusi. Kudinate lugemise perioodil 12-14 päeval kōdistati kõiki rotte ühekaupa ning ühe ja sama eksperimentaatori poolt.

Kudinaid loeti hiljem poolautomaatselt Avisoft SASLab Pro tarkvara (Avisoft Bioacoustics, Berliin, Saksamaa) abil. Kõigepealt vaadati helifailidest loodud spektrogrammid (Fourier' kiirteisendus e. FFT (1024 analüüsiakna pikkus, 75% lõik, Hamming-aken, 75% aja akna

kattumine)) käsitsi üle ja puhastati need mürast. Seejärel luges arvutiprogramm automaatselt kokku 50-kHz häälsused (häälsused, mille sagedus oli üle 38 kHz).

Tulemused

Statistiline analüüs

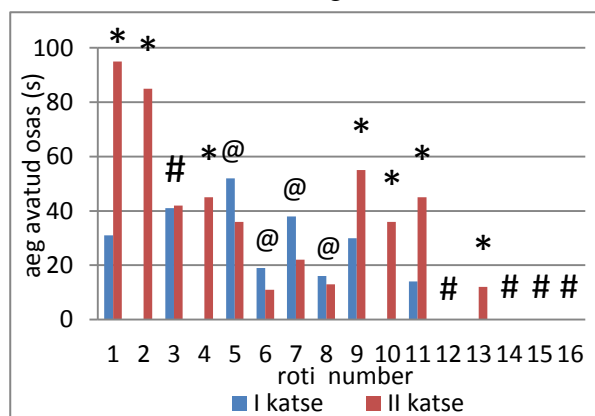
Andmeid analüüsiti programmidega Excel ja SPSS Statistics (versioon 20). Kuna rotiemade valimi suurus oli väike ja paljud muutujad ei olnud normaaljaotusega, kasutati plusspuuri andmete analüüsiks mitteparameetrilisi teste ning emakäitumise ja poegade häälightsuste juures ka parameetrilisi teste, kui andmete olemus seda lubas. Statistiliste analüüside juures kasutati olulisusnivood 0,05.

Plusspuuri testide võrdlus

Kahe plusspuuri testi tulemuste võrdluseks kasutati Spearmani mitteparameetrilist korrelatsiooni. Kasutades kõigi rottide ($n=20$) andmeid, korreleerusid kahe testikorra lõikes oluliselt mitmed avatud osa käitumised: jooneületuste arv avatud osas ($r_s=0,68$; $p=0,001$), avatud ossa sisenemiste arv ($r_s=0,63$; $p<0,01$), aeg avatud osas ($r_s=0,57$; $p<0,01$), latents avatud ossa sisenemisel ($r_s=0,53$; $p<0,05$) ja pealangevus avatud osas ($r_s=0,61$; $p<0,01$). Vaadates aga ainult emade ($n=16$) andmeid, ilmnedid kahe testikorra vahel olulised korrelatsioonid vaid avatud osa jooneületuste arvus ($r_s=0,54$; $p<0,05$) ja negatiivne korrelatsioon nina tsessepanekus ($r_s=-0,66$; $p<0,01$).

Edasi kontrolliti hüpoteesi, et emaks saamise järgseks testimiseks on rottide ärevus üldiselt alanenud. Selleks kasutati Wilcoxon'i astakmärgi testi. Analüüsides kahe testikorra avatud osa aegu, ei leidunud statistiliselt olulist erinevust I ja II plusspuuri testi vahel ($Z=-1,8$; $p=0,07$), kuigi tendents erinevuseks oli olemas ja ka mediaanide erinevus oli küllaltki suur: need olid I ja II testil vastavalt 7 ja 29 sekundit. Sarnaseid tulemusi andis ka kahe testi avatud osa jooneületuste arvude võrdlus ($Z=-1,8$; $p=0,07$). Samas viitab avatud/kogu sisenemiste suhte võrdluses testidevahelise erinevuse puudumine ($Z=-0,5$; $p=0,58$) sellele, et rottide avatud osa avastamine kasvas tänu üldisele liikumisaktiivsuse kasvule.

Testimaks kõrvalisi mõjusid peale emaduse, viidi analüüs läbi esialgse rotigrupiga ($n=20$), kaasates ka 4 mitte emaks saanud rottit. Wilcoxon'i astakmärgi testi järgi olid rotid teisel plusspuuri testil avatud osa aja järgi



Joonis 1: kahe plusspuuri testi võrdlus avatud osa aja osas. @ = I testil kauem; # = erinevusega; * = II testil kauem

oluliselt vähem ärevad ($Z = -2,1$; $p < 0,05$) ning siingi oli näha muutuse taga üldise liikumisaktiivsuse kasvu: avatud/kogu sisenemiste suhe ei erinenud ($Z = -0,5$; $p = 0,61$).

Vaadates lähemalt kahe testikorra tulemusi avatud osa aja kohta (Joonis 1), mis on üheks klassikaliseks ärevuse indikaatoriks plusspuuri testis (ülevaade Sidor jt, 2010), võis rotid jagada kolme gruppi: teisel korral vähem aega avatud osas viibinud (kõrgenenud ärevusega rotid), teisel korral praktiliselt sama kaua avatud osas viibinud (stabiilse ärevusega rotid) ja teisel korral kauem avatud osas viibinud (alanenud ärevusega rotid). Viimase grupi alla liigitati muuhulgas kõik rotid, kes sisenesid avatud ossa vaid teistkordsel testil, kuna mittesisenemise ja sisenemise vahel on märkimisväärne kvalitatiivne erinevus. Tabelis 1 on toodud gruppide erinevused pesakonna suuruselt ja mõlemat testi võrdse kaaluga arvestav grupi keskmine ärevusskoor 100-pallisel skaalal.

Avatud osa aja järgi moodustatud gruppide siseselt korreleerusid kahe testi andmed vähe. II korral kauem avatud osas viibinute grupis olid olulised korrelatsioonid kahe testikorra vahel vaid avatud osa jooneületuste arvus ($r_s = 0,81$; $p < 0,05$) ja latentsis tsentrisse sisenemisel ($r_s = 0,76$; $p < 0,05$). Erinevusega

käitumise grupis korreleerusid oluliselt avatud osa tegevused, kuid tulemuste tõlgendamisel peab arvestama, et enamiku sellest grupist moodustasid rotid, kes kummalgi korral avatud osa ei uudistanud. I testil kauem avatud osas viibinute grupis olulisi korrelatsioone ei leidunud.

Tabel 1: Avatud osa aja muutumise järgi moodustatud gruppide kirjeldavad statistikud

	Keskmine kahe		
Avatud osas viibitud aeg	Rottide arv grupis	testi summaarskoor (100p)	Keskmine pesakonna suurus
I test kauem erinevusega	4	41	5,3
II test kauem	5	12	11,9
	7	38	7,9

Märkus: Pesakonna suuruse erinevused ei olnud statistiliselt olulised: $H(2) = 4,8$; $p = 0,09$

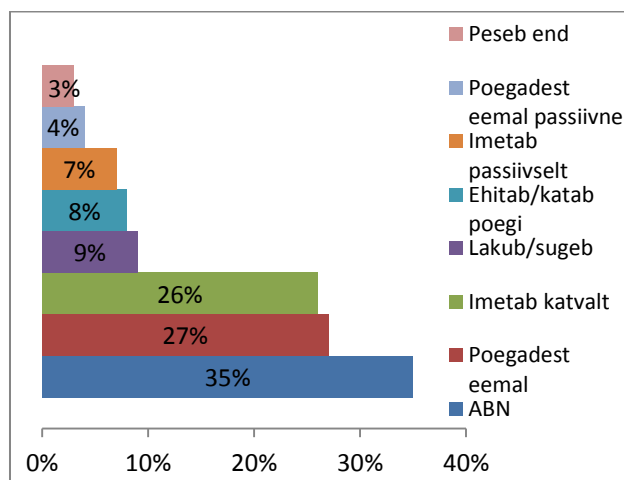
Et kahe testikorra jooneületuste arvud avatud osas korreleerusid kõige paremini ning samuti oli avatud osa jooneületuste arv kummalgi testikorral heas korrelatsioonis teiste avatud osa käitumistega, siis kasutati ka seda näitajat rottide ärevuse iseloomustamiseks. Kõigepealt arvutati iga roti jaoks kahe testi koondskoor 100-pallisel skaalal (kumbki test 50-pallise osakaaluga) ning jagati siis rotid mediaani ($Mdn = 34$) alusel palju ja vähe avatud osa avastavateks rottideks. Tulemused varieerusid 0...100. Gruppide keskmised skoorid koos standardhälvetega olid vastavalt $62 \pm 7,6$ ja $9 \pm 4,3$. Et välistada pesakonna suuruse mõju gruppide eristuvusele edaspidistes võrdlustes emakäitumise osas, kontrolliti üle, et grupid pesakonna suuruselt statistiliselt ei erine ($U = 23,5$; $p = 0,36$).

Vaadates avatud osa jooneületuste arvu järgi moodustatud grupe eraldi, ei olnud palju avatud osa avastanute grupis kahe testi käitumised oluliselt korreleeritud ning vähe avatud osa avastanute grupis korreleerus negatiivselt kahe testi SAP-ide arv ($r_s = -0,71$; $p < 0,05$).

Emakäitumise analüüs

Emakäitumist hinnati 16 pesakonna järgi, kus oli 4-14 poega, keskmiselt $10,4 \pm 2,3$. Emakäitumise kohta teostati kokku 875 vaatlust. Käitumised ei olnud üksteist välistavad, nii et korraga võis esineda ka mitu tegevust. Joonisel 2 on toodud iga käitumise keskmine esinemissagedus kõigist vaatlustest. Kõige enam, 35% vaatlustest, esines kumera seljaga imetamist. Järgnesid poegadest eemalviibimine ja kattev imetamine. Lakkumist ja sugemist – teist head emahoole kvaliteedi näitajat kumera seljaga imetamise kõrval – esines tunduvalt vähem: 9% kordadest.

Kuna hindajaid oli kaks, teostati ka nendevahelise reliaabluse mõõtmised. Kolme vaatluskorra kokkuvõttes korreleerusid hindajate vastused hästi. Kõige madalam korrelatsioon oli katva imetamise osas ($r = 0,81$; $p = 0,005$) ning kõige kõrgem poegadest eemaloleku osas ($r = 0,99$; $p < 0,001$). Ülevaade kõigist tulemustest on toodud Tabelis 2.



Joonis 2: Erinevate käitumiste esinemissagedus kõigist pesakonna vaatlustest (875)

Tabel 2: Emakäitumise vaatlajatevahelised korrelatsioonid kolme vaatluse summaarsete skooride alusel

Käitumine	Hindajatevaheline korrelatsioon r
Lakub/sugeb	0,91**
Imetab kumera seljaga	0,96**
Imetab katvalt	0,81*
Imetab passiivselt	0,97**
Peseb end	0,86**
Ehitab pesa/katab poegi	0,94**
Poegadest eemal	0,99**

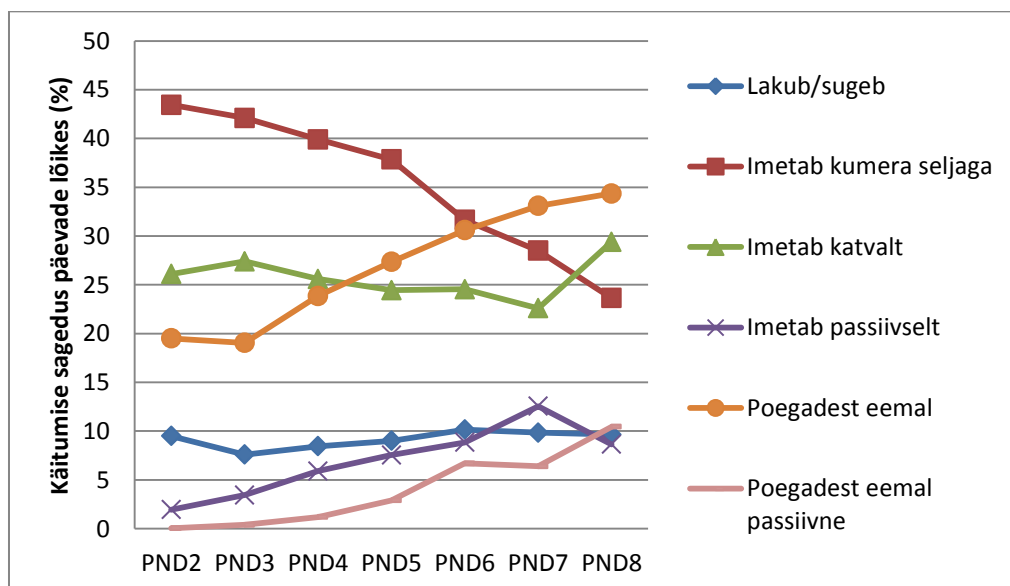
* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Shapiro-Wilk'i test näitas, et käitumised nagu lakkumine/sugemine, kumera seljaga imetamine, kattev imetamine, ehitamine / poegade katmine, enda pesemine ja poegadest eemal viibimine olid rottide hulgas normaalselt jaotunud. Normaalkaotusele ei vastanud passiivne imetamine ja poegadest eemal passiivne olek. Oluline on märkida, et pesakondade suurus võis emakäitumist teatud määral mõjutada: mida rohkem oli poegi, seda vähem tegeles ema katva imetamisega ($r_s = -0,63$; $p < 0,01$). Ka lakkumise ja sugemisega esines piirilähedase olulisusega korrelatsioon ($r_s = -0,49$; $p = 0,057$).

Mõned olulised korrelatsioonid olid ka emakäitumiste vahel: kumera seljaga imetamine oli negatiivselt seotud poegadest eemalolekuga ($r=-0,73$; $p=0,001$) ja poegadest eemal passiivse olekuga ($r_s=-0,59$; $p<0,05$). Samuti oli poegadest eemalolekul negatiivne korrelatsioon enese pesemisega ($r=-0,67$; $p<0,01$) ja positiivne korrelatsioon passiivse poegadest eemalolekuga ($r_s=0,69$; $p<0,01$). Välja arvatati ka kogu kontakt poegadega (kõik imetamisstiilid ja lakkumine/sugemine kokku), mis oli oluliselt seotud kumera seljaga imetamisega ($r=0,74$; $p<0,001$), enese pesemisega ($r=0,59$; $p<0,05$) ning negatiivselt poegadest eemalolekuga ($r=-0,94$; $p<0,001$) ja poegadest eemal passiivse olekuga ($r_s=-0,72$; $p<0,01$).

Huvitav tähelepanek on siinkohal kumera seljaga imetamise ja lakkumise/sugemise mittekorreleeruvus ($r=0,19$; $p=0,47$), kuna varasemad tööd on leidnud nende käitumiste vahel tugeva seose (Champagne jt, 2003).

Analüüsidest erinevaid käitumisi päevade kaupa (Joonis 3), selgus, et kumera seljaga imetamine esines kõige enam esimestel sünnijärgsetel päevadel ning selle sagedus päev-päevalt langes. Tegu oli populaarseima imetamisviisiga kaheksanda päevani, mil seda viimaks sageduselt ületas kattev imetamine. Iga päevaga kasvas passiivse imetamise osakaal ning aina rohkem veetsid emad aega poegadest eemal ja poegadest eemal passiivselt lamades. Lakkumine ja sugemine püsis päevade lõikes enam-vähem stabiilsena ning samuti püsis ka katva imetamise osakaal. Ka üldine imetamise osakaal päevastest tegevustest pidevalt langes: kui teisel sünnijärgsel päeval esines imetamist 72% vaatluskordadest, siis kaheksandaks päevaks oli see kukkunud 62%-ni.



Joonis 3: Tähtsamate emakäitumiste osakaalu muutus päevade lõikes. Joonisel ei kajastu enese pesemine, mis oli päevade lõikes stabiilne ja pesa ehitamine/poegade katmine, mis päev-päevalt kahanes. PND - päev alates sünnist.

Emakäitumise ja plusspuuri testide vahelised seosed

Et uurida, kas emakäitumine erineb ka plusspuuri andmete järgi moodustatud gruppide vahel, viidi kõigepealt läbi ANOVA avatud osa aja erinevuse järgi moodustatud gruppidega. Grupid eristusid emakäitumise andmetest kumera seljaga imetamise ($F(2;13)=4,2$; $p<0,05$) ja katva imetamise osas ($F(2;13)=10,1$; $p<0,01$). Tukey post-hoc testist selgus, et II katsel kauem avatud osas olnud rotid imetasid oluliselt rohkem kumera seljaga (keskmiselt 350 ± 57 korda), kui I katsel kauem avatud osas olnud rotid (keskmiselt 247 ± 40 korda, $p<0,05$). Samuti, et I katsel kauem avatud osas olnud rotid imetasid rohkem katvalt (275 ± 23 korda), kui II katsel kauem avatud osas viibinud (222 ± 37 korda, $p<0,05$) ja stabiilse käitumisega rotid (190 ± 15 korda, $p<0,01$). Et emad, kelle ärevus oli teiseks testiks alanenud, olid imetamisstiililt aktiivsemad, viitab sellele, et madalam ärevus on kohane kvaliteetsemaks hoolitsuskäitumiseks.

Avatud osa jooneületuste arvu järgi moodustatud ärevamate ja vähem ärevate rottide gruppide vahel erinevusi emakäitumises ei leitud (Studenti t testi või Mann-Whitney U järgi, vastavalt emakäitumisele).

Vaadati ka emakäitumist seotuna mõlema plusspuuri testiga individuaalselt, mille tulemusi võib näha Tabelis 3, kus lühiduse huvides on ära toodud vaid muutujad, millel oli teistega olulisi seoseid. Tulemustest selgub, et rohkem kumera seljaga imetamisega tegelevad emad olid küll ettevaatlikumad (I testil läks neil kauem aega tsentrisse sisenemiseks ning II testil tegelesid nad avatud osas rohkem riskihindamisega pealangetuste näol), aga kokkuvõttes vähem ärevad, kuna II testil viibisid nad kauem avatud osas ja üldisest haarade avastamisest moodustas neil suurema osa avatud haarade avastamine.

Tihti katvalt imetavad rotid olid I testil pigem vähe ärevad: nad sisenesid I korral kiiremini avatud ossa ning II korral kiiremini tsentrisse. I korral külastasid nad avatud osa rohkem kordi ning lisaks esines neil ka kalduvus veeta seal kauem aega ($r_s=0,44$; $p=0,09$), mida Tabel 3 välja ei too. Rohkem passiivselt imetavaid rotte võib pidada I testil ärevamateks, kuna nad veetsid rohkem aega tsentris ja tegelesid seal rohkem pealangetustega. Selgelt eristub, et rotid, kes veetsid enam aega poegadest eemal, olid II testis ärevamad, mida näitavad mitmed negatiivsed korrelatsioonid avatud osa käitumistega.

Analüüsides ärevuskäitumise seoseid üldise poegadega kontaktiga (kõik imetamisstiilid ja lakkumine/sugemine), näitavad mitmed seosed, et rohkem poegadega kontaktis olnud rotid käitusid II plusspuuri testis vähem ärevalt.

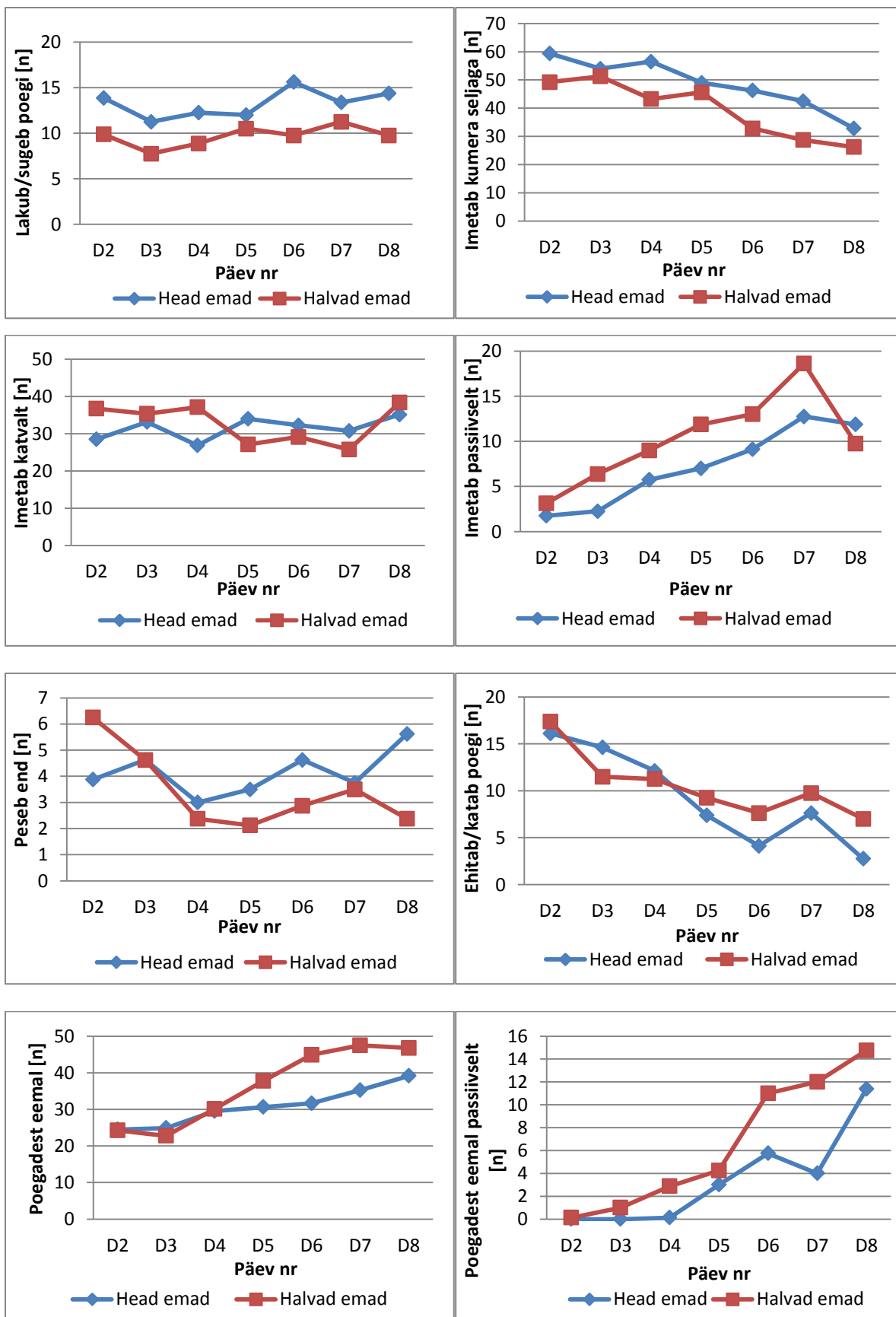
Tabel 3: Olulised korrelatsioonid emakäitumise ja kummagi plusspuuri testi vahel

	ABN	BN	PN	P	E	EP	KP
Pealangetus tsentrist I	-,17	-,13	,79**	,36	,34	-,27	,15
Jooneületused avatud osas I	-,14	,39	,20	,54*	-,13	-,26	,16
Avatud ossa sisenemised I	-,24	,54*	,09	,53*	-,13	-,17	,10
Aeg tsentris I	-,22	-,25	,79**	,06	,38	-,14	,01
Latents avatud ossa sisenemisel I	,31	-,56*	,02	-,38	,29	-,01	,04
Latents tsentrisse sisenemisel I	,54*	-,38	-,35	-,22	,18	-,11	,11
Avatud/kokku sisenemiste arv I	-,19	,47	,04	,56*	-,14	-,13	,07
Pealangetus avatud osas II	,56*	,21	,08	,19	-,43	-,54*	,60*
Pealangetus tsentris II	,31	,09	,22	,33	-,51*	-,47	,64**
Jooneületused avatud osas II	,47	,29	,20	,37	-,42	-,61*	,62*
Avatud ossa sisenemised II	,49	,27	,21	,41	-,40	-,66**	,67**
Aeg avatud osas II	,50*	,30	,15	,34	-,32	-,59*	,61*
Latents avatud ossa sisenemisel II	-,23	-,42	-,26	-,44	,06	,56*	-,50*
Latents tsentrisse sisenemisel II	,01	-,64**	-,02	-,30	,45	,27	-,25
Avatud/kokku sisenemiste arv II	,53*	,25	,14	,26	-,32	-,61*	,64**

Märkused: * $p=0.05$ ** $p=0.01$, $n=16$. ABN=kumera seljaga imetamine; BN=kattev imetamine; PN=passiivne imetamine; P=enese pesemine; E=ehitamine; EP=eemal poegade; KP=kontakt poegade

Emahoole kvaliteedi alusel gruppide moodustamiseks saab kasutada mitmeid näitajaid. Populaarseimad neist on kumera seljaga imetamine ja poegade lakkumine/sugemine. Võimalik on kasutada ka kogu kontakti poegade, mis summeerib kõik imetamiskäitumised ning poegade lakkumise ja sugemise.

Esimesena testiti levinud meetodit, mis arvestab nii kumera seljaga imetamist kui lakkumist ja sugemist. Igale rotile anti skoor 100-pallisel skaalal, mis moodustus 50% lakkumise ja sugemise tulemusest ning 50% kumera seljaga imetamise tulemusest. Rottide maksimaalne ja minimaalne skoor olid vastavalt 96,2 ja 56,1. Keskmise tulemus oli 73,1. Saadud skooride järjestuse alusel jaotati rotid mediaani ($Mdn=69,6$) mööda tinglikult „headeks“ ja „halbadeks“ emadeks. Joonisel 4 on toodud nende gruppide erinevused emakäitumise osas.



Joonis 4: Käitumiste esinemissageduse võrdlus kumera seljaga imetamist ja lakkumist/sugemist arvestava „heade“ ja „halbade“ emade jaotuse järgi

Plusspuuri tulemuste järgi need kaks gruppi eriti ei eristunud, mille põhjuseks on tõenäoliselt lakkumise ja sugemise mittekorreleeruvus ärevuse tulemustega. Ilmnes, et esimeses testis esines *stretched attend posture* halbade emade grupil keskmiselt sagedamini ($3\pm 1,2$) kui headel emadel ($1,5\pm 1,1$): $t(14)=-2,4$; $p<0,05$. Teises testis oli heade emade keskmine aeg tsentris ($89\pm 22,8$) pikem kui halbadel emadel ($64\pm 18,4$): $t(14)=2,3$; $p<0,05$.

Uuriti ka, kas lakkumise ja sugemise, kogu poegadega kontakti või kumera seljaga imetamise alusel jaotamine võimaldab ennustada rottide ärevuskäitumist. Neist parimaks lahenduseks osutus kumera seljaga imetamise alusel jagamine. Kumera seljaga imetamise vaatluspäevade koguskooride mediaani ($Mdn=299$) mööda jagamisel moodustatud halbade emade grupp oli teistkordsel plusspuuri testil rohkem ärev kui heade emade grupp, mida näitab nende loomade suurem avatud osa avastamine. Tulemused on toodud Tabelis 4.

Tabel 4: Kumera seljaga imetamise alusel moodustatud „heade“ ja „halbade“ emade grupi eristuvus plusspuuri tulemuste osas

	Head <i>M</i> ± <i>SD</i>	Halvad <i>M</i> ± <i>SD</i>	<i>df</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Jooneületused avatud osas II	12±9,1	4±3,9	14	2,2	0,042
Avatud ossa sisenemised II	2±1,7	0,9±0,8	10,649	2,3	0,041
Aeg avatud osas II	46±32,5	16±17,2	14	2,3	0,035
Avatud/kokku sisenemiste suhe II	0,27±0,15	0,11±0,12	14	2,2	0,042

Märkused: *M*: keskmine; *SD*: standardhälve; *df*: vabadusastmete arv; *t*: t-väärtus sõltumatute gruppide t-testis; *p*: statistiline olulisus

Rotipoegade ultrahelihäälitsuste analüüs

Poegade arv 16 pesakonna peale kokku oli 170, kellest emaseid 86. Lõplikku analüüsi jäi 81 isast ja 86 emast, kellest kahe puhul saadi andmeid ainult 13. päeva kohta. Teatavad erinevused olid häälitsuste arvus sugude vahel. Mann-Whitney U testi järgi oli emastel kahe päeva kokkuvõttes isastest oluliselt rohkem 22 kHz häälitsusi ($U=2633,5$; $p<0,01$) ja vähem 50 kHz häälitsusi ($U=2537,5$; $p<0,01$).

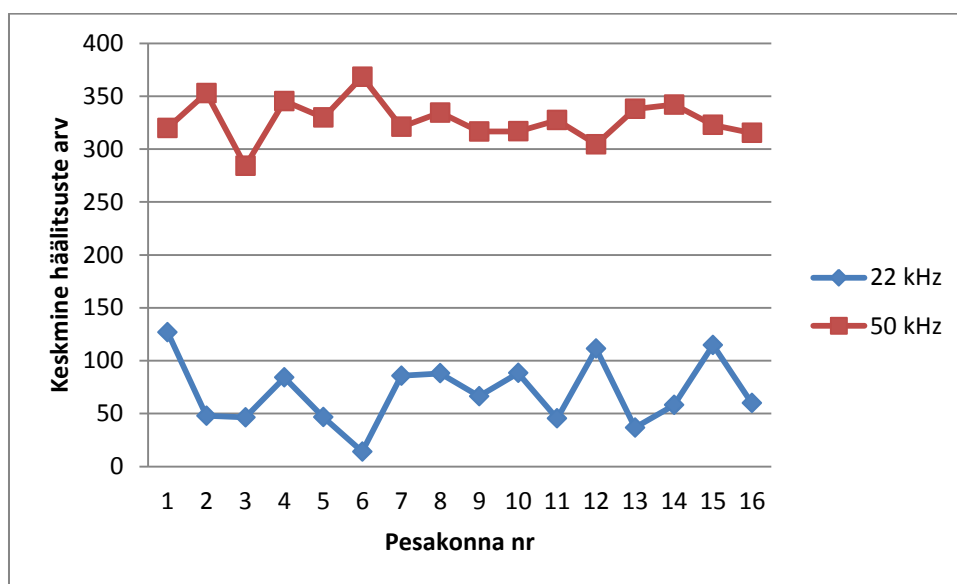
Rottide häälitsused korreleerusid kahe päeva võrdluses hästi: 22 kHz häälitsused $r_s=0,76$; $p<0,001$ (sealjuures emastel $r_s=0,73$; $p<0,001$ ja isastel $r_s=0,80$; $p<0,001$) ning 50 kHz häälitsused $r=0,67$; $p<0,001$ (emastel $r=0,61$; $p<0,001$ ja isastel $r=0,72$; $p<0,001$). Roti kahe päeva keskmine 22 kHz häälitsuste arv oli negatiivselt seotud kahe päeva keskmise 50 kHz häälitsuste arvuga: $r_s=-0,42$; $p<0,001$. Emastel eraldi oli seos natuke tugevam ($r_s=-0,43$; $p<0,001$) ja isastel natuke nõrgem ($r_s=-0,33$; $p<0,01$).

Tabel 5: Emaste ja isaste poegade keskmised häälightsuste arvud

			<i>N</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Päev 13							
22 kHz häälightsused	emased		86	82	70	0	255
	isased		81	61	50	0	229
50 kHz häälightsused	emased		86	315	85	174	533
	isased		81	352	66	172	492
Päev 14							
22 kHz häälightsused	emased		84	92	70	0	228
	isased		81	56	53	0	192
50 kHz häälightsused	emased		84	305	94	73	494
	isased		81	336	74	143	502

Märkus: *N*: rottide arv; *M*: keskmine; *SD*: standardhälve; *Min*: miinimum; *Max*: maksimum

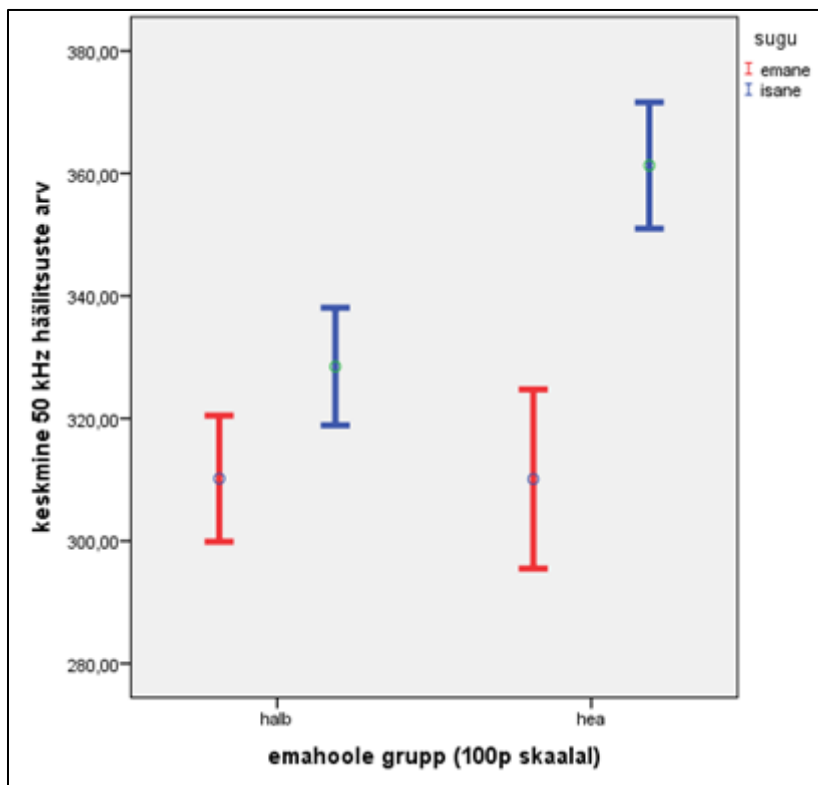
Kuna pesakondade suurused olid erinevad, leiti ka iga pesakonna poegade keskmine 22 ja 50 kHz häälightsuste arv mõlema päeva kohta. Pesakonna suurus pesakonna keskmist häälightsuste arvu ei mõjutanud ega teinud seda ka emaseid ja isaseid poegi eraldi arvestades. Joonisel 5 on toodud iga pesakonna keskmine kahe päeva kokkuvõtlik häälightsuste arv.

**Joonis 5:** Pesakonna rottide keskmised 22 ja 50 kHz häälightsuste arvud

Seosed poegade häälightsuste ja emakäitumise vahel

Rohkem kumera seljaga imetavate emade pesakondades oli keskmiselt rohkem 50 kHz häälightsusi ($r=0,62$; $p=0,01$). 22 kHz häälightsusi oli vähem neis pesakondades, kus emad pesid end tiheimini ($r=-0,69$; $p<0,01$) ja veetsid vähem aega poegadest eemal ($r=0,51$; $p<0,05$). Ka summaarne kontakt poegadega oli negatiivses seoses pesakonna 22 kHz häälightsuste arvuga ($r=-0,51$; $p<0,05$).

Emaseid ja isaseid eraldi analüüsid osutus poegadest eemalviibimine oluliseks ainult emaste stressihäälitsuste puhul ($r=0,66$; $p<0,01$) ning selgus, et seos ema pesemisega on tugevam emastel poegadel ($r=-0,70$; $p<0,01$). Kumera seljaga imetamise ja lakkumise/sugemise 100-pallise koondskoori järgi heade ja halbade emade erinevus 50 kHz häälitsustes tuli välja vaid isaste poegade puhul (Joonis 6), kes töid kuuldavale keskmiselt rohkem 50 kHz häälitsusi ($361\pm 63,6$), kui halbade emade isased pojad ($328\pm 62,9$): $t(79)=2,3$; $p<0,05$. 22 kHz häälitsusi oli heade emade poegadel keskmiselt vähem ($59\pm 53,6$) kui halbade emade poegadel ($85\pm 61,3$): $U=2569$; $p<0,01$. See erinevus kehtis ka eraldi emaste ($U=674$; $p<0,05$) ja isaste poegade puhul ($U=593,5$; $p<0,05$).



Joonis 6: Kumera seljaga imetamise ja lakkumise/sugemise alusel „heade“ ja „halbade“ emade poegade eristuvus 50 kHz häälitsustelt

Ainult kumera seljaga imetamise või poegadega kontakti järgi loodud heade ja halbade emade grupid häälitsuste poolest ei eristunud.

Lakkumise ja sugemise põhjal moodustatud grupid eristusid keskmise 22 kHz häälitsuste arvu poolest ($U=2714$; $p<0,05$), kusjuures heade emade poegadel oli neid vähem ($63\pm 6,7$) kui halbade emade poegadel ($82\pm 6,1$).

Ultrahelihäälitsuste seosed ema ärevuskäitumisega

Pesakonna isaste kahe päeva keskmine 50 kHz häälitsuste arv oli korreleeritud mitmete emade II testi avatud osa käitumisega: jooneületustega avatud osas ($r=0,55$; $p<0,05$), avatud osasse sisenemiste arvuga ($r=0,51$; $p<0,05$), avatud osasse sisenemistega kõigist sisenemistest ($r=0,61$; $p<0,05$), ajaga avatud osas ($r=0,50$; $p<0,05$) ning avatud osa pealangetustega ($r_s=0,58$; $p<0,05$). Samuti I testi SAP-iga ($r=0,50$; $p<0,05$).

Pesakonna emaste kahe päeva keskmised 22 kHz häälitsused seostusid negatiivselt I testi avatud osasse sisenemiste arvuga ($r_s=-0,55$; $p<0,05$), avatud osa jooneületustega ($r_s=-0,57$; $p<0,05$) ning avatud osasse sisenemiste suhtega kõigisse sisenemistesse ($r_s=-0,52$; $p<0,05$).

Jooneületuste arvu või avatud osa aega kasutades moodustatud ärevuse grupid poegade häälitsustelt ei eristunud.

Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli uurida emahoole kvaliteeti mõjutavaid tegureid ning kvaliteetsema emahoole mõju poegade püsivale positiivsele afektiivsusele. Vaadeldi emaduse ja emahoole seoseid ärevusega ning rotipoegade kogetud emahoole mõju hiljem kōdistamisel loetud 50 kHz häälightsuste arvule.

Ärevuse muutumine emaks saamisega seoses

Esimene hüpotees, mis ennustas, et emaks saamise kogemus alandab rottide ärevust, ei leidnud kinnitust. Kuigi Wilcoxon'i astakmärgi testiga emade tulemusi analüüsid oli märgata kalduvust madalamaks ärevuseks teisel plusspuuri testil, leiti, et seos on isegi tugevam, kui kaasati analüüsi ka 4 mitte emaks saanud rott. Samuti võis tulemustest välja lugeda, et muutus ei olnud tingitud vaid ärevuse langusest, vaid tõusnud oli ka rottide üldine liikumisaktiivsus – avatud haaradesse sisenemiste arvu suhe kõikidesse haaradesse sisenemiste arvu ei olnud oluliselt muutunud.

Saadud tulemused on tähelepanuväärsed, kuna enamasti on probleemiks hoopis teistkordsel plusspuuri testil avatud osa avastamise alanemine. Selle põhjuseks peetakse seda, et juba tuttavas katsesituatsioonis ei ole rottide avastamishuvi enam nii suur ning seetõttu ohtlike alade vältimise ja uue avastamishuvi vahel konflikti ei teki (Carobrez ja Bertoglio, 2005). Käesoleva töö katsed olid üles ehitatud nii, et minimaliseerida teistkordse testi tuttavust, kuid see ei tohiks kaasa tuua esmasest suuremat avastamishuvi. Ka vanusega seoses on pigem täheldatud avatud osa aktiivsuse vähenemist vanuse kasvades (ülevaade Andrade, Tomé, Santiago, Lúcia-Santos, ja de Andrade, 2003).

Ärevuse tase võib olla seotud ka innatsükli staadiumiga: Marcondes, Miguel, Melo ja Spadari-Bratfisch (2001) leidsid, et proöstruses oli rottide (kõrgemast östradioli tasemest mõjutatult) avatud osa avastamine suurem, kuid erinevust üldises liikumisaktiivsuses ei olnud. Üheks ühiseks tunnuseks kõigil katse rottidel on kontakt isase rotiga, mis võis käitumist muuta, sõltumata tiinuse tekkest. Vähemasti isaste paaritatud preeria-uruhiirtega on leitud, et nende ärevus plusspuuri testis oli paaritamata hiirtest madalam (Insel, Preston ja Winslow, 1995). Erinevuse tegelikke tekkepõhjuseid on praeguse info põhjal aga raske kindlaks määrata, eriti arvestades ilmnenu üldise liikumisaktiivsuse tõusu, mis on ärevuse muutumise mõõtmisel segavaks mõjaks.

Emahoole kvaliteedi sõltuvus ema ärevusest

Teiseks hüpoteesiks oli, et emahoole kvaliteet sõltub ema ärevusest. See hüpotees leidis mitmeid kinnitavaid tõendeid. Vaadeldes rotte, kelle ärevus teiseks plusspuuri testiks alaneks, ilmnis nende sagedasem kumera seljaga imetamisega tegelemine, mis annab kinnitust, et ärevuse alanemine on hea hoolitsuskäitumise esinemiseks kohane. Teisel testil esinesid ka korrelatsioonid madalama ärevuse ja rohkema kumera seljaga imetamise vahel ning kõrgema ärevuse ja suuremal määral poegadest eemal viibimise vahel. Seega on tulemused kooskõlas varasemate leidudega, et kvaliteetsem emahool on seotud madalama ärevusega ning ei lange kokku Inga Neumanni grupi katsete tulemustega, kus just kõrgem ärevus esines koos parema emahoolega (ülevaade Bosch ja Neumann, 2012). Erinevate tulemuste põhjuseks on tõenäoliselt viimatimainitud katsetes kasutatud kõrge ja madala ärevuse järgi aretatud loomad, kelle puhul võib ka emakäitumise profiil olla kujunenud sihipäraselt aretamata loomadest erinevaks. Kuna antud katses ärevuse järgi aretatud loomi ei kasutatud, siis on tulemused üsna ootuspärased.

Huvitaval kombel ei korreleerunud lakkumine ja sugemine üldse kummagi plusspuuri testi tulemustega, ega ka kumera seljaga imetamisega. Selle seletuseks võib olla, et erinevad emakäitumise komponendid on erineval viisil seotud ema motivatsiooni ja ärevuse ning väliste poegade seotud stiimulitega. Vaatluskogemuse põhjal on lakkumine ja sugemine ning kumera seljaga imetamine ka teataval määral omavahel konkureerivad: kumera seljaga imetamine esineb pigem siis kui rotid on pühendunud imetamisele ning lakkumise ja sugemise ajal on imetamine raskendatud.

Eri käitumisi käivitavad erinevad stiimulid. On täheldatud, et emasrottide imetamiseks kohase liikumatuse ja kumera seljaga asendi tekkeks on vajalik poegade poolne ventraalne stimulatsioon ja imemine (Lonstein, Wagner ja De Vries, 1999). „Aktiivsemaid“ emakäitumisi nagu lakkumine ja sugemine võivad mõjutada nii poegadelt pärinevad signaalid (nt somatosensoorsed signaalid, ultrahelihäälitsused) kui ka ema füsioloogiline vajadus elektrolüütide järele, mida ta poegade uriinist saab (Stern, 1996; Lonstein jt, 1999). Nii kumera seljaga imetamise, lakkumise ja sugemise kui ka üldise poegade kontaktis viibimise juures on tähtis ka ema motivatsioon mingi tegevuse juures püsida. Kõige selle juures peab veel arvestama, et lisaks emade erinevale reaktiivsusele võis ka poegade poolne stimulatsioon olla erineva tugevusega. Seda näiteks poegade arvu või nende (häälitsus)aktiivsuse erinevuse tõttu.

Kattev ja passiivne imetamine kui kumera seljaga imetamisest vähem aktiivsed emakäitumised, olid korreleerunud pigem esimese plusspuuri testiga. Passiivne imetamine

seondus sealjuures enam tsentri tegevusega ja riskihindamiskäitumistega tsentris, mis tähendab, et esialgselt ärevamad rotid olid emaks saades väheaktiivse imetamisstiiliga. Kahjuks pole selge, miks ei õnnestunud seda kinnitada teistkordse plusspuuri testiga. Võimalik, et keskkonnatingimused pärast pesakondade vaatlusperioodi lõppu ja enne teistkordset testi mõjusid rottidele erinevalt, nii et seos polnud enam selgelt väljenduv.

Üks huvitav arutelupunkt on emakäitumisest enese pesemise esinemine. Tulemused näitasid antud tegevuse korreleeruvust mitmete teiste käitumistega. Näiteks kogu kontakt poegadega oli enese pesemisega positiivselt korreleeritud, seega emad, kes hoolitsesid palju poegade eest, hooldasid ka ennast rohkem. Lisaks korreleerus enese pesemine I plusspuuri testi avatud osa tegevustega, mis näitab, et madalam ärevus võib lisaks paremale emahoolele olla seotud ka parema enese eest hoolitsemisega. Üldiselt arvatakse, et rottide enese hooldamine võib vastavalt täpsele käitumismustrile olla seotud nii stressi kui mugavustundega, kuid kuna selle töö raames erinevaid enese pesemise viise ei vaadeldud, siis ei saa me anda hinnangut ka enese pesemise olemuse kohta (Kalueff, Tuohimaa, 2005).

Emadus ja poegade ultrahelihäälitsused

Kolmandaks hüpoteesiks oli kõrge emahoole kvaliteedi seos poegade suurema positiivse afektiivsusega, mille indikaatorina kasutati suurt 50 kHz häälitsuste arvu kōdistamisel. See hüpotees leidis kinnitust, kuna ilmnes, et sage kumera seljaga imetamine korreleerus pesakonna poegade hulgas keskmiselt suurema 50 kHz häälitsuste arvuga. Kui 22 kHz häälitsusi tõlgendada kui vastupidist, negatiivse afektiivsuse seisundit, siis saab eelnevat kinnitavaks lugeda tulemusi, et ema vähesem poegadest eemal (ja rohkem poegadega kontaktsetes tegevustes) viibimine oli seotud pesakonna poegade keskmiselt väiksema 22 kHz häälitsuste arvuga.

See kehtis ka emahoole kvaliteedi järgi moodustatud gruppide võrdluses. Arvestades võrdses mahus kumera seljaga imetamist ning lakkumist ja sugemist, ilmnes parema emahoole grupis isastel poegadel kehvemate emade grupi isastest poegadest enam 50 kHz positiivse afektiivsuse häälitsusi. 22 kHz häälitsusi oli „heade“ emade mõlemast soost poegadel vähem kui „halbade“ emade omadel.

Viimatimainitud seost oli võimalik kinnitada ka kasutades ainult lakkumist ja sugemist emahoole kvaliteedi gruppide moodustamiseks. See, et rohkem lakkuvate ja sugevate emade pojad tõid kuuldavale vähem 22 kHz stressihäälitsusi, võib viidata just lakkumise ja sugemise tähtsusele poegade häälitsuste kujunemisel. On leitud, et poegade häälitsused käivitavad emal poegade lakkumise ja sugemise, kuid võimalik, et poegadel, kelle ema reageeris nende

häälightsustele kiiremini lakkumisega, kujunes välja väiksem vajadus distressi korral häälightseda või et neile, kes noorena said emalt rohkem taktilist stimulatsiooni lakkumise ja sugemise näol, põhjustas kõdistamisel toimuv stimuleerimine vähem stressi.

Tulevikuperspektiiv ja töö nõrgad küljed

Kuna antud uuring oli pigem loomulikult esinevat olukorda uurivat laadi, siis on raske eristada geneetilisi ja keskkonnast tingitud mõjusid ning mõnede põhjuslike seoste kohta võib teha vaid oletusi. Edaspidistes uurimustes oleks huvitav vaadelda kõdistamisel palju ja vähe 50 kHz häälitsevate emade hoolitsuskäitumist, kui neile on kasvatada antud vastavalt vähe ja palju häälitsevate emade pojad. Seeläbi oleks võimalik täpsemalt uurida emahoole ja poegadepoolsete stiimulite (eelkõige häälitsemise) vastasmõju. Samuti oleks huvitav mõõta poegade häälightsusi juba esimestel elunädalatel, et uurida nende seost hiljem välja kujunevate 22 ja 50 kHz häälightsuste mustri.

Üheks raskuseks töö tulemuste tõlgendamisel on ebavõrdne poegade arv pesakondades, mis varieerus 4-14 pojani. Nagu ilmselt ka käesolevas töös, võib poegade arv teataval määral emakäitumist mõjutada. Suurem poegade arv seostus katva imetamise harvema esinemisega ning võis samas suunas mõjutada ka lakkumist ja sugemist, kuigi seos napilt statistiliselt oluline ei olnud. Edaspidistes katsetes on võimalik pesakonna suurused standardiseerida, mis kaotaks pesakonna poegade vahelise ebavõrdse konkurentsi võimaliku segava mõju.

Teataval määral võivad tulemused olla mõjutatud ka väikesest katsegrupist (n=16). Kuna emade arv oli väike, olid mõnevõrra piiratud näiteks meetodid, mille abil rotte gruppidesse jagada, et tagada piisav gruppide suurus. Mõõtmisi oleks hea korrata pisut suurema katsegrupiga, mis tõstaks tulemuste valiidsust ja võimaldaks kvartiile kasutades paremini võrrelda ärevuselt või emakäitumiselt kumbagi äärmusesse kalduvaid rotte. Sellegipoolest on tähelepanuväärne, et olulisi tulemusi leidis ka käesolevas katsegrupis.

Antud töö võimaldas koguda täiendavad infot emakäitumise ja ärevuse seose kohta. Tegu on ühega vähestest uurimustest, kus on vaadeldud ärevuse muutumist kindlas rotigrupis läbi emaks saamise kogemuse ja seda selektiivselt paljundamata rottidel. Leiti seoseid madalama ärevuse ja parema emahoole vahel ning võimalikke märke sellest, et erinevad emahoole komponendid on ärevusega erineval moel seotud. Üheks töö uudseks küljeks oli emahoole ja poegade kõdistamisel kuuldavale toodavate häälightsuste seose uurimine. Ilmselt, et poegade 50 kHz häälightsuste esinemissagedus sõltub teataval määral emahoole kvaliteedist ning seos on tugevam isaste poegade puhul. Samuti leiti, et emahool mõjutab poegade 22 kHz häälightsusi, mis võib olla eriti seotud emahoole taktilise komponendiga. Saadi kinnitust, et emahoolel on

oluline roll järglaste positiivse afektiivsuse ja võimalik, et ka stressile reaktiivsuse väljakujunemisel.

Viited

- Adamec, R., & Shallow, T. (2000). Effects of baseline anxiety on response to kindling of the right medial amygdala. *Physiology & behavior*, *70*(1), 67-80.
- Adamec, R., Shallow, T., & Burton, P. (2005). Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling—role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. *Behavioural brain research*, *159*(1), 73-88.
- Andrade, M. M. M., Tomé, M. F., Santiago, E. S., Lúcia-Santos, A., & de Andrade, T. G. C. S. (2003). Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & behavior*, *78*(1), 125-133.
- Bertoglio, L. J., & Carobrez, A. P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, *108*(2), 197-203.
- Bialy, M., Rydz, M., & Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behavioral neuroscience*, *114*(5), 983.
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural brain research*, *166*(2), 271-280.
- Bosch, O. J. (2011). Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. *Hormones and behavior*, *59*(2), 202-212.
- Bosch, O. J., Krömer, S. A., & Neumann, I. D. (2006). Prenatal stress: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *European Journal of Neuroscience*, *23*(2), 541-551.
- Bosch, O. J., & Neumann, I. D. (2008). Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(44), 17139-17144.
- Bosch, O. J., & Neumann, I. D. (2012). Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Hormones and behavior*, *61*(3), 293-303.
- Bosch, O. J., Pförtch, J., Beiderbeck, D. I., Landgraf, R., & Neumann, I. D. (2010). Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Journal of neuroendocrinology*, *22*(5), 420-429.
- Branchi, I., Santucci, D., & Alleva, E. (2001). Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behavioural brain research*, *125*(1), 49-56.
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., & Vigouroux, M. (1992). Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behavioural brain research*, *50*(1), 147-154.
- Brunelli, S. A. (2005). Selective breeding for an infant phenotype: rat pup ultrasonic vocalization (USV). *Behavior genetics*, *35*(1), 53-65.

- Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S. M., Kroes, R., & Moskal, J. R. (2005). Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. *Behavior genetics*, 35(1), 67-72.
- Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12736-12741.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & behavior*, 79(3), 359-371.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.
- D'Amato, F. R., Scalera, E., Sarli, C., & Moles, A. (2005). Pups call, mothers rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalizations in mouse pups?. *Behavior genetics*, 35(1), 103-112.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5335-5340.
- Caldji, C., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biological psychiatry*, 48(12), 1164-1174.
- Francis, D. D., Champagne, F. C., & Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *Journal of neuroendocrinology*, 12(12), 1145-1148.
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 327(1), 1-5.
- Ihnat, R., White, N. R., & Barfield, R. J. (1995). Pup's broadband vocalizations and maternal behavior in the rat. *Behavioural processes*, 33(3), 257-271.
- Insel, T. R., Preston, S., & Winslow, J. T. (1995). Mating in the monogamous male: behavioral consequences. *Physiology & Behavior*, 57(4), 615-627.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of neuroscience methods*, 143(2), 169-177.
- Kessler, M. S., Bosch, O. J., Bunck, M., Landgraf, R., & Neumann, I. D. (2011). Maternal care differs in mice bred for high vs. low trait anxiety: impact of brain vasopressin and cross-fostering. *Social neuroscience*, 6(2), 156-168.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological bulletin*, 128(6), 961.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73(3), 255-260.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal

- glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659-1662.
- Lonstein, J. S. (2007). Regulation of anxiety during the postpartum period. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28(2), 115-141.
- Lonstein, J. S., Wagner, C. K., & De Vries, G. J. (1999). Comparison of the “nursing” and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. *Hormones and behavior*, 36(3), 242-251.
- Maier, E. Y., Ahrens, A. M., Ma, S. T., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2010). Cocaine deprivation effect: cue abstinence over weekends boosts anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behavioural brain research*, 214(1), 75-79.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & behavior*, 74(4), 435-440.
- Moore, C. L. (1992). The Role of Maternal Stimulation in the Development of Sexual Behavior and Its Neural Basis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 662(1), 160-177.
- Mällo, T., Matrov, D., Herm, L., Kõiv, K., Eller, M., Rincken, A., & Harro, J. (2007). Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behavioural brain research*, 184(1), 57-71.
- Mällo, T., Matrov, D., Kõiv, K., & Harro, J. (2009). Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. *Neuroscience*, 164(3), 963-974.
- Myers, M. M., Brunelli, S. A., Squire, J. M., Shindeldecker, R. D., & Hofer, M. A. (1989). Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Developmental psychobiology*, 22(1), 29-53.
- Neumann, I. D., Krömer, S. A., & Bosch, O. J. (2005a). Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology*, 30(8), 791-806.
- Neumann, I. D., Wigger, A., Krömer, S., Frank, E., Landgraf, R., & Bosch, O. J. (2005b). Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience*, 132(3), 867-877.
- Numan, M. & Stolzenberg, D. S. (2008). Hypothalamic interaction with the mesolimbic dopamine system and the regulation of maternal responsiveness. *Neurobiology of the parental brain*, 3-22.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (1999). Laughing rats? Playful tickling arouses high frequency ultrasonic chirping in young rodents. *Toward a science of consciousness III*, 231-244.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
- Popik, P., Potasiewicz, A., Pluta, H., & Zieniewicz, A. (2012). High-frequency ultrasonic vocalizations in rats in response to tickling: The effects of restraint stress. *Behavioural brain research*, 234(2), 223-227.

- Raudkivi, K., Maello, T., & Harro, J. (2012). Effect of chronic variable stress on corticosterone levels and hippocampal extracellular 5-HT in rats with persistent differences in positive affectivity. *Acta Neuropsychiatrica*, *24*(4), 208-214.
- Roy, V., Chapillon, P., Jeljeli, M., Caston, J., & Belzung, C. (2009). Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. *Psychopharmacology*, *203*(1), 131-141.
- Ruthschilling, C. A., Albiero, G., Lazzari, V. M., Becker, R. O., de Moura, A. C., Lucion, A. B., Almeida, S., Gorini da Veiga, A. B., & Giovenardi, M. (2012). Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. *Behavioural brain research*, *228*(1), 176-184.
- Sidor, M.M., Rilett, K., Foster J.A. (2010). Validation of an automated system for measuring anxiety-related behaviours in the elevated plus maze. *Journal of neuroscience methods*, *188*, 7-13.
- Siviy, S. M., & Panksepp, J. (2011). In search of the neurobiological substrates for social playfulness in mammalian brains. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(9), 1821-1830.
- Stern, J. M., & Johnson, S. K. (1990). Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology & behavior*, *47*(5), 993-1011.
- Stern, J. M. (1996). Somatosensation and maternal care in Norway rats. *Advances in the Study of Behaviour*, *25*, 243-294.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, *2*(2), 322-328.
- Wartella, J., Amory, E., Macbeth, A., McNamara, I., Stevens, L., Lambert, K. G., & Kinsley, C. H. (2003). Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiology & behavior*, *79*(3), 373-381.
- Weaver, I. C., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(9), 3480-3485.
- Willey, A. R., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2009). Social interactions and 50kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. *Behavioural brain research*, *202*(1), 122-129.
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2008). Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behavioral neuroscience*, *122*(2), 310.

Käesolevaga kinnitan, et olen korrektselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele.

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Lisanna Pertens