



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εμπλουτισμός Περιβάλλοντος και Φυσιολογία Εργαστηριακού Μυός

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ (ΑΜ)

Ευδοκία Μηνούδη (18678130)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Δρ. Χρύσα Βογιατζάκη

Εργαστήριο Μοριακής
Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Σχολή Επιστημών Υγείας και
Πρόνοιας
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δρ. Νικόλαος

Κωστομητσόπουλος

Μονάδα Ζωικών Προτύπων, Κέντρο
Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής
και Μεταφραστικής Έρευνας
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
Ακαδημίας Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACILITY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
Department of Biomedical Sciences
Division: Medical Laboratories

DISSERTATION

**Environmental Enrichment and Physiology of
Laboratory Mouse**

STUDENT NAME (CM)

Evdokia Minoudi (18678130)

SUPERVISORS

Dr. Chrysa Voyiatzaki

Laboratory of Molecular Microbiology
and Immunology
Department of Biomedical Sciences
Faculty of Health and Care Sciences
University of West Attica

Dr. Nikolaos Kostomitsopoulos

Laboratory Animal Facility
Clinical, Experimental Surgery and
Translational Research
Biomedical Research Foundation of the
Academy of Athens

ATHENS 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**ΧΡΥΣΑ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ**

Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα
Βιοϊατρικών
Επιστημών, Τομέας Ιατρικών
Εργαστηρίων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΩΣΤΟΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΣ

Μονάδα Ζωικών Προτύπων,
Κέντρο Κλινικής,
Πειραματικής, Χειρουργικής
και Μεταφραστικής
Έρευνας
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών
Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

Ακαδημαϊκή υπότροφος,
Τμήμα Βιοϊατρικών
Επιστημών, Τομέας
Ιατρικών Εργαστηρίων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής

EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP

CHRYSA VOYIATZAKI

Assistant Professor, Department
of Biomedical Sciences,
University of West
Attica

NIKOLAOS KOSTOMITSOPOULOS



Laboratory Animal Facility
Clinical, Experimental
Surgery and
Translational Research
Biomedical Research
Foundation of the
Academy of Athens

MARIA TSOUMANI

Academic Fellow,
Department of
Biomedical Sciences,
University of West
Attica

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μηνούδη Ευδοκία του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 18678130, φοιτήτρια του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, της σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το επιστημονικό περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ευδοκία Μηνούδη



Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα ήταν δυνατό να εκπονηθεί χωρίς τη συνδρομή ορισμένων προσώπων, προς τα οποία θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Ανοσολογίας και Παρασιτολογίας, Δρ. Χρυσάνθη Βογιατζάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, παρέχοντας μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με την παρούσα εργασία, να γνωρίσω και να συνεργαστώ με αξιόλογα πρόσωπα και εν δυνάμει να ξεκινήσω την πορεία μου στην βιοϊατρική έρευνα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα Α' Βαθμίδας και Υπεύθυνο Μονάδας Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Δρ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο, ο οποίος εκδήλωσε πραγματικό ενδιαφέρον για την ένταξή μου στην ερευνητική διαδικασία και συνεισέφερε καθοριστικά στον σχεδιασμό και στην υλοποίηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό στην Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος, που με υποδέχτηκε με χαμόγελο και ευγένεια και με καθοδήγησε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και της συγγραφής της εργασίας. Η στήριξη και το αίσθημα ασφάλειας που μου παρείχε ήταν πολύτιμα κατά τα πρώτη επαφή με το συγκεκριμένο αντικείμενο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που στάθηκε στο πλευρό μου και με στήριζε κατά την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας, όπως άλλωστε και κατά τη διάρκεια όλης της ακαδημαϊκής μου σταδιοδρομίας.

Περίληψη

Παρά την εκτεταμένη χρήση των μυών στη βιοϊατρική έρευνα, υπάρχει έντονος προβληματισμός της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με τη συγκεκριμένη. Για την ηθική αξιοποίηση των ζώων στο εργαστήριο αλλά και για την εξασφάλιση περισσότερο αναπαραγωγίμων πειραματικών αποτελεσμάτων, ο σχεδιασμός πειραμάτων επιβάλλεται να πραγματοποιείται με σύνεση και να λαμβάνονται υπόψη όλες οι παράμετροι που ενδυνάμει επηρεάζουν την πειραματική διαδικασία. Μια από αυτές τις παραμέτρους είναι οι συνθήκες στέγασης των εργαστηριακών μυών. Καίριο ρόλο διαδραματίζει ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος, που αναφέρεται ως η τροποποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών στέγασης των ζώων, με σκοπό τη βελτίωση της βιολογικής λειτουργίας τους. Στη συγκεκριμένη εργασία επιδιώκεται να ερμηνευθεί η έννοια και οι μέθοδοι εμπλουτισμού περιβάλλοντος, εμβαθύνοντας πολύ περισσότερο στην επίδραση που έχει η ενίσχυση της στρωμνής τόσο στο περιβάλλον στέγασής τους (θερμοκρασία, υγρασία κλωβών και επίπεδο καθαρότητας στρωμνής) και όσο και στους μύες (θερμοκρασία σώματος, σωματικό βάρος, κατανάλωση τροφής και συμπεριφορά εντός του κλωβού). Οι υπό εξέταση συνθήκες στέγασης, αφορούσαν κλωβούς με όγκο στρωμνής 0,4L, που χρησιμοποιείται στην καθημερινή πράξη και σε κλωβούς με όγκο στρωμνής 1,6L. Η μελέτη αφορούσε δύο διαφορετικές σειρές μυών. Η μια σειρά αφορούσε ζώα αγρίου τύπου (wild type) τα 129SV και η δεύτερη σειρά γενετικά τροποποιημένα ζώα knockout (de-/de-), τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά. Κύριο εύρημα της μελέτης, είναι η επίδραση του μεγάλου όγκου στρωμνής στην υγρασία εντός των κλωβών, καθώς συνεισφέρει σε χαμηλότερες και πιο σταθερές τιμές. Δεν υπήρξε ίδια ανταπόκριση και στις τιμές της θερμοκρασίας. Παράλληλα σε εμπλουτισμένες συνθήκες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη τάση των ζώων για σκάψιμο και περισσότερο ενεργή παρουσία εντός του κλωβού, όπως επίσης και πιο καθαρή επιφάνεια στρωμνής, κάτι που υποδηλώνει ότι αναμφίβολα υπήρξε κάποια επίδραση στη συμπεριφορά. Σε ότι αφορά την θερμοκρασία του σώματος, το σωματικό βάρος του σώματος και την κατανάλωση τροφής δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συνδυαστικά με αντίστοιχες αναφορές στη βιβλιογραφία, επισημαίνουν τα οφέλη χρήσης αυξημένης ποσότητας στρωμνής κατά τη στέγαση μυών.

Abstract

Even though laboratory mice have been used at great extent in biomedical research, concerns about their utilization continue to be expressed. In order to achieve ethical use of rodents and more reproducible results, a detailed experimental design, including the evaluation of all possible parameters that affect the research, is crucial. Housing of mice is one of the parameters. The role of environmental enrichment, which is any modification of housing conditions that can elevate mouse physiology, is important. In the following paper the importance of environmental enrichment will be explained, focusing more at the effect of deep bedding in the cage microenvironment (cage temperature, cage humidity, bedding soiling) and mouse physiology (body temperature, body weight, food intake, behavior in the cage), which will be further investigated at research level. Mice were housed in conventional conditions with volume of bedding material being 0,4 L and enriched conditions with 1,6 L. To achieve plurality, wildtype (129SV) and knockout (de-/de-) mice, both male and female, were used. An important finding is the role of deep bedding in humidity regulation, with enriched cages showing lower and more stable humidity values. Deep bedding does not seem to contribute in heat insulation of cages in the current study. Furthermore, in cages with deep bedding, mice tend to dig more and show greater locomotor activity, but also the upper surface of the bedding material appeared to be cleaner. Differences in body temperature, body weight and food intake were not observed, so it was difficult to make any hypothesis about mice metabolism. Current results, combined with references from bibliography, highlight the benefits of using enrichment in bedding volume during mouse housing.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	I
Περίληψη	II
Abstract	III
Πίνακας Περιεχομένων	IV
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	V
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Εργαστηριακές συνθήκες στέγασης	1
1.1.1 Θερμοκρασία στέγασης και θερμική φυσιολογία μυός	1
1.1.2 Υγρασία Περιβάλλοντος	5
1.1.3 Επίπεδα Αμμωνίας	5
1.2 Εμπλουτισμός περιβάλλοντος	5
1.2.1 Υλικό για τη σύνθεση φωλιάς (Nesting Material)	6
1.2.2 Καλύμματα και σπίτια για τρωκτικά	9
1.2.3 Συλλογική Στέγαση (Social/Group Housing)	10
1.2.4 Παιχνίδια για τρωκτικά	11
1.2.5 Ενίσχυση όγκου στρωμνής (Enrichment in bedding volume)	13
1.3 Η παρούσα μελέτη	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 Ζώα πειραματισμού	18
2.2 Συνθήκες στέγασης	18
2.3 Πειραματικός σχεδιασμός	20
2.4 Μέτρηση θερμοκρασίας και υγρασίας δωματίου και κλωβού	23
2.5 Μέτρηση θερμοκρασίας σώματος	23
2.6 Μέτρηση σωματικού βάρους και κατανάλωσης τροφής	23
2.7 Επιτήρηση ζώων και αξιολόγηση της συμπεριφοράς εντός κλωβού	23
2.8 Στατιστική ανάλυση	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη θερμοκρασία κλωβού	25
3.2 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στην υγρασία κλωβού	25
3.3 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη θερμοκρασία σώματος	26
3.4 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στο σωματικό βάρος	27
3.4 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στην κατανάλωση τροφής	28
3.5 Επίπεδο καθαρότητας στρωμνής	28
3.6 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη συμπεριφορά	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	31
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αξιοποίηση των μυών γένους *Mus musculus* είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη σε εφαρμογές βιοϊατρικών επιστημών εδώ και πολλές δεκαετίες, και η χρήση τους δεν προβλέπεται να περιοριστεί στο άμεσο μέλλον. Αποτελούν τρωκτικά και ανήκουν στην οικογένεια *Muridae*, που ενσωματώνει 281 γένη και πάνω από 73.000 φυλές (μέχρι 01/2023, σύμφωνα με Mouse Genome Informatics¹). Η χρήση των μυών ως πρότυπα στην βιοϊατρική έρευνα για πρώτη φορά φαίνεται να χρονολογείται τον 17ο αιώνα, σε μελέτες του Robert Hooke για την βιολογική σημασία του οξυγόνου σε ζωντανούς οργανισμούς αλλά και τις συνέπειες που επιφέρει η αύξηση της ατμοσφαιρικής πίεσης σε αυτούς^{1,2,3}. Το γεγονός ότι οι μύες είναι τόσο προσφιλείς στην πειραματική βιοϊατρική έρευνα δεν είναι τυχαίο. Η μεγάλη γενετική ομοιογένεια σε σχέση με το ανθρώπινο γονιδίωμα, το πλέον πλήρως κατανοητό ανοσολογικό σύστημα, το μικρό μέγεθος που προσδίδει ευκολία στους χειρισμούς, η συντομία στην περίοδο κύησης και ο μεγάλος αριθμός απογόνων σε κάθε τοκετό, είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά των μυών που επιτρέπουν την ευρεία χρήση τους στη διεξαγωγή ερευνητικών πειραμάτων^{4,5}. Η εφαρμογή του εργαστηριακού μυός ως πειραματικό μοντέλο παρατηρείται σε ευρεία ποικιλία πεδίων στην ιατροβιολογική έρευνα, λόγου χάρη σε μελέτες ανθρωπίνων διαταραχών φυσιολογίας, λοιμώξεων, ψυχολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών, σε τοξικολογικές έρευνες, κατά την παρατήρηση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας μοσχευμάτων, σε οδοντιατρικές μελέτες, στον έλεγχο φαρμάκων και στην ανάπτυξη εμβολίων⁶.

Προκειμένου να κριθεί επιτυχής μια πειραματική έρευνα, οφείλει να παράγει αξιόπιστα, επαναλήψιμα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Για την επίτευξη αυτών, καίρια είναι η σημασία ενός σωστού και πλήρως μελετημένου πειραματικού σχεδιασμού, κατά τον οποίο έχουν εκτιμηθεί όλες οι παράμετροι και συνθήκες υπό τις οποίες υλοποιείται το πείραμα. Επομένως, κατά τον σχεδιασμό λαμβάνονται αποφάσεις όπως η επιλογή ζωικού προτύπου (φυλή, φύλο, γονότυπος), η προσαρμογή των συνθηκών στέγασης, η επιλογή διατροφής, η επιλογή τυχόν χορηγούμενου παρασκευάσματος και τρόπου χορήγησης, οι μέθοδοι εκτίμησης παραμέτρων και δεικτών φυσιολογίας, τα χρησιμοποιούμενα υλικά και ο τρόπος ανάλυσης των προκύπτοντων αποτελεσμάτων με τελικό σκοπό την διαμόρφωση ενός ορθολογικού πορίσματος. Φαινομενικά οι αποφάσεις που αφορούν τη στέγαση των ζώων δείχνουν ελάχιστος σημασίας, ωστόσο παράγοντες όπως ο τύπος κλωβού, η θερμοκρασία και υγρασία στο δωμάτιο στέγασης, ο ρυθμός εξαερισμού, η ένταση φωτισμού στο δωμάτιο, η πυκνότητα των μυών στο κλουβί, ο θόρυβος, το είδος στρωμνής αλλά και ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος, δύνανται να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στην έκβαση των αποτελεσμάτων. Παρακάτω θα μελετηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο η θερμοκρασία, υγρασία και αμμωνία περιβάλλοντος, επηρεάζουν τη φυσιολογία των μυών και κατά συνέπεια τα πειραματικά αποτελέσματα⁷.

1.1 Εργαστηριακές συνθήκες στέγασης

1.1.1 Θερμοκρασία στέγασης και θερμική φυσιολογία μυός

¹ <https://www.informatics.jax.org/>

Προτού αναλυθεί ο τρόπος με τον οποίον η θερμοκρασία περιβάλλοντος επηρεάζει τη φυσιολογία, καλό θα ήταν να αναφερθούν κάποιες βασικές πληροφορίες σχετικά με τη θερμική φυσιολογία στον μυ. Η θερμο-ουδέτερη ζώνη των μυών (Thermo-neutrality Zone - TNZ) είναι ένα μικρό φάσμα θερμοκρασιών περιβάλλοντος (1-3°C), κατά το οποίο οι μύες εμφανίζουν βέλτιστη βιολογική λειτουργία. Οριοθετείται από το κατώτερο (lower critical temperature) και το ανώτερο όριο της θερμοκρασίας (upper critical temperature)⁸. Πιο συγκεκριμένα, σε τιμή θερμοκρασίας 29°C βρίσκονται οι μύες σε θερμοουδετερότητα. Η TNZ εξαρτάται από το μέγεθος του σώματος, το σωματικό βάρος, την μορφολογία, τη γενική βιολογική ακεραιότητα και από τον βασικό μεταβολικό ρυθμό. Η κεντρική θερμοκρασία σώματος των μυών εμφανίζει μεταβλητότητα κατά τη διάρκεια του 24ώρου, καθώς εξαρτάται από τους κερκάρδιους ρυθμούς. Εξ αιτίας αυτής της προσαρμοστικότητας της θερμοκρασίας του σώματος στις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι μύες έχουν χαρακτηριστεί ως “ευκαιριακά” ενδόθερμα ζώα και λιγότερο ως “αληθή” ενδόθερμα, κάτι που επιβεβαιώνεται από την ικανότητα θερμορύθμισης⁹.

Στις συμβατικές συνθήκες στέγασης, οι μύες στεγάζονται σε θερμοκρασία που συνήθως ανέρχεται στους 20-24°C, δηλαδή χαμηλότερη από την TNZ¹⁰. Αυτή η διαφορά στις τιμές της θερμοκρασίας δεν θα πρέπει να θεωρείται αμελητέα, καθώς επηρεάζει με ποικίλους τρόπους την υγεία των μυών, και κατ’ επέκταση τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών. Όταν οι μύες στεγάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κάτω από το κατώτερο όριο της TNZ, επάγεται θερμικό στρες. Σε αυτή την κατάσταση, ενεργοποιείται το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και παρατηρείται αύξηση του αριθμού παλμών ανά λεπτό¹¹. Παράλληλα αυξάνεται ο μεταβολικός ρυθμός κατά 50-60%, διότι εκτός από τις βασικές ανάγκες (ανάπτυξη, φυσική δραστηριότητα, αναπαραγωγή), ο μεταβολισμός καλείται να καλύψει πλέον και την ανάγκη για θερμορύθμιση, μια διαδικασία που αναλύεται στη συνέχεια. Επίσης αυξάνεται η κατανάλωση τροφής, σε αισθητά επίπεδα ακόμα και 24 ώρες μετά την πτώση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος¹¹.

Θερμορύθμιση στους μύες

Προκειμένου οι μύες να επιβιώσουν στο ψυχρό αυτό περιβάλλον, ξεκινούν ένα σύνολο μεταβολικών διεργασιών, γνωστό ως θερμορύθμιση. Η θερμορύθμιση, δηλαδή η μετατροπή αποθηκευμένης στον οργανισμό ενέργειας σε θερμότητα, διακρίνεται σε συμπεριφορική και μεταβολική. Οι μεταβολές στην συμπεριφορά είναι η πρώτη ένδειξη εκκίνησης του θερμορυθμιστικού μηχανισμού. Εντός της θερμο-ουδέτερης ζώνης, οι μύες εμφανίζουν σταθερή κεντρική θερμοκρασία, με κανονική στάση σώματος, χωρίς εμφανή σημεία απώλειας νερού (δηλαδή εφίδρωση, υγρασία στην επιφάνεια του σώματος μετά από grooming)⁸. Πιο χαρακτηριστικές συμπεριφορές θερμορύθμισης είναι η θερμότητα, η δημιουργία φωλιάς και η αλλαγή στην στάση του σώματος. Θερμότητα είναι η τάση των μυών να διαβιούν σε περιβάλλοντα (περιοχές των κλωβών, κατά την εργαστηριακή στέγαση) με υψηλότερη θερμοκρασία. Η θερμότητα είναι πιο πιθανή κατά την φωτεινή φάση του κύκλου, όταν είναι μειωμένη η φυσική δραστηριότητα. Ο σχηματισμός φωλιάς, εκτός από την σημασία του στον τοκετό, αποτελεί μηχανισμό συμπεριφοράς με σκοπό τη θερμορύθμιση. Οι μύες διαμορφώνουν φωλιές, στις οποίες διαβιούν, προστατεύοντας τους εαυτούς τους από θερμικό στρες λόγω χαμηλών περιβαλλοντικών θερμοκρασιών. Επιπλέον, οι μύες που εκτίθενται σε ψυχρά περιβάλλοντα, αλλάζουν τη στάση του σώματος τους, ελαττώνοντας την επιφάνεια που καταλαμβάνουν. Οι μυϊκές ίνες της επιδερμίδας συσπώνται και έτσι

έχουμε ανόρθωση των τριχών. Σε συνθήκες συλλογικής στέγασης, οι μύες πλησιάζουν μεταξύ τους. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η μείωση της επιφάνειας του σώματος και ενισχύεται η μεταφορά θερμότητας από το ένα ζώο στο άλλο. Σπάνια οι μύες βρίσκονται σε εγγύτητα όταν οι περιβαλλοντικές θερμοκρασίες βρίσκονται εντός της ζώνης TNZ, με την συμπεριφορά αυτή να είναι πιο χαρακτηριστική σε ψυχρές θερμοκρασίες¹².

Ως προς την μεταβολική θερμορύθμιση, διακρίνεται σε θερμορύθμιση με ρίγος και η θερμορύθμιση χωρίς ρίγος. Η πρώτη εξ αυτών αποτελεί αντίδραση σε απόλυτες συνθήκες ψύχους, απειλητικές για τη ζωή. Η δεύτερη ενεργοποιείται σε μερικές συνθήκες ψύχους, με σκοπό τη διατήρηση της κεντρικής θερμοκρασίας σώματος και συναντάται πιο συχνά στην καθημερινότητα των εργαστηριακών μυών, οι οποίοι συνήθως υποβάλλονται σε ήπιο θερμικό στρες σε καθημερινή βάση. Η θερμορύθμιση χωρίς ρίγος λαμβάνει χώρα στον καφέ λιπώδη ιστό. Τα λιπώδη κύτταρα αυτού του ιστού είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια, με αυξημένη δραστηριότητα οξειδωτικού μεταβολισμού και καλύπτονται από αδρενεργικούς υποδοχείς. Παρουσία ψυχρών ερεθισμάτων, τα κύτταρα αυτά διεγείρονται από ορμόνες του θυρεοειδούς αδένος, από κατεχολαμίνες που παράγονται από μακροφάγα και με τη δράση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Ως αποτέλεσμα αυτής της διέγερσης, αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης UCP1 (uncoupling protein-1) στα καφέ λιπώδη κύτταρα, οδηγώντας σε παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη UCP1 επιδρά στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, επηρεάζοντας τη βαθμίδα πρωτονίων και συντελώντας στην παραγωγή θερμικής ενέργειας^{12 13}.

Θερμοκρασία στέγασης και πειραματικά αποτελέσματα

Με βάση τα παραπάνω, καθίσταται κατανοητό πως όταν οι μύες βρίσκονται υπό λειτουργία θερμορύθμισης, σημειώνονται μεταβολές στην φυσιολογία τους. Έχει παρατηρηθεί πως αυτές οι μεταβολές που οφείλονται στην θερμοκρασία περιβάλλοντος, αντανακλώνται σε αποτελέσματα πειραμάτων που χρησιμοποιούν ως ζωικά πρότυπα τους μύες. Συνεπώς η θερμοκρασία στέγασης αποτελεί παράγοντα που θα οφείλει να λαμβάνεται υπ' όψη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.

Ποιότητα ύπνου Η στέγαση των μυών σε θερμοκρασία που να προσεγγίζει τη ζώνη θερμο-ουδετερότητας οδηγεί σε παρατεταμένη διάρκεια ήρεμου ύπνου (slow wave sleep - SWS), αλλά και ύπνου REMS (Rapid Eye Movement Sleep)¹⁴.

Μέγεθος οργάνων και αναλογία σώματος Στα πλαίσια της εκτίμησης του μεγέθους των οργάνων στις προκλινικές μελέτες, είναι σωστό να λαμβάνεται υπ' όψη ο παράγοντας της θερμοκρασίας στην οποία στεγάζονται τα ζώα. Με τη στέγαση σε συνθήκες θερμο-ουδετερότητας, ο μεταβολικός ρυθμός είναι μειωμένος σε σχέση με τη στέγαση σε συμβατικές συνθήκες (T=20°C), διότι δεν απαιτείται ενίσχυση του μεταβολισμού για θερμορύθμιση. Ως αποτέλεσμα, σε συμβατικές συνθήκες παρατηρείται αυξημένο μέγεθος σε όργανα όπως το ήπαρ, η καρδιά και οι νεφροί. Κάτι που έχει παρατηρηθεί ακόμα είναι ότι σε θερμο-ουδετερότητα αυξάνεται το μήκος της ουράς των μυών, ενδεχομένως λόγω της αυξημένης αιματικής ροής, η οποία ενισχύει την ανάπτυξη των σπονδύλων στην ουρά. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη μάζα του σώματος ως προς τη θερμοκρασία στέγασης¹⁵.

Μεταβολισμός γλυκόζης Καθώς η στέγαση σε χαμηλές θερμοκρασίες ενεργοποιεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, παρατηρείται μείωση στην έκκριση ινσουλίνης. Αυτή είναι η αιτία, που μετά τη χορήγηση γλυκόζης σε μύες που στεγάζονταν στους 20°C παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης αίματος σε σχέση με τους μύες που στεγάζονταν στους 25°C. Συνεπώς, κατά την εκτέλεση πειραματικών δοκιμών που αφορούν τον διαβήτη, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία στέγασης των μυών¹⁶.

Καρδιαγγειακό σύστημα Πέρα από την μεταβολή στον αριθμό των παλμών που επιφέρουν οι διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, καθώς σε συνθήκες θερμοουδετερότητας οι παλμοί ανέρχονται περίπου στους 350/λεπτό και σε θερμοκρασία 20°C ανεβαίνουν στους 500-600/λεπτό, επηρεάζονται σημαντικά και άλλες παράμετροι του καρδιαγγειακού συστήματος. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί πτώση στην αρτηριακή πίεση της τάξεως των 20 mmHg μετά από αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος από 20°C σε 30°C. Η ταχυκαρδία που επάγεται από τη μείωση στην θερμοκρασία στέγασης των μυών, αποδεικνύεται επίσης από τον παρατηρούμενο αυξημένο καρδιακό τόνο. Τα δεδομένα αυτά πρέπει να αξιολογούνται όταν επιτηρείται η καρδιακή φυσιολογία των μυών¹⁷.

Καρκίνος Εικάζεται πως, επειδή η στέγαση σε περιβαλλοντική θερμοκρασία κάτω από την TNZ των μυών επάγει θερμικό στρες, συνεπικουρεί στην πιο γρήγορη ανάπτυξη καρκίνου. Πρόκειται για κάτι που όμως δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και υπάρχουν αντιθέσεις, καθώς σύμφωνα με τους Kokolus et. al, η θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν επέδρασε σημαντικά στον ρυθμό ανάπτυξης όγκων σε μύες στελέχους SCID και σε μύες χωρίς τρίχωμα¹⁸. Οι ίδιοι επίσης παρατήρησαν πως τα καρκινικά κύτταρα που είχαν εγχύσει τοπικά, εμφάνισαν πιο μεγάλες μεταστάσεις στους πνεύμονες σε μύες που στεγάζονταν σε θερμοκρασία 22°C σε σχέση με μύες που στεγάζονταν στους 30°C, προτείνοντας αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας στέγασης με την μεταστατική δραστηριότητα. Φαίνεται να υπάρχει όμως αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος με την αντικαρκινική θεραπεία, όπως έδειξαν οι Wei-Liang Eng και συνεργάτες¹⁹.

Ανοσοποιητικό σύστημα Σε θερμικό στρες, αυξάνεται η έκφραση γλυκοκορτικοειδών, υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, προκειμένου να υποστηριχθεί η θερμορύθμιση. Όμως τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν ένα σύνολο διαδικασιών, που τελικά συνεισφέρουν στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, καθιστώντας τους μύες πιο ευαίσθητους σε μικροβιακούς παράγοντες²⁰. Η ανασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών που παράγονται σε αντιδράσεις άγχους έχει έχει περιγραφεί αναλυτικώς²¹.

Γενικότερα, το θερμικό αυτό στρες δεν συναντάται στην καθημερινότητα των φυσιολογικών ανθρώπων, επομένως οι μεταβολικοί ρυθμοί των φυσιολογικών ανθρώπων δεν συνάδουν με εκείνους των εργαστηριακών μυών που φυλάσσονται σε πρότυπες συνθήκες στέγασης. Αυτό είναι μείζονος σημασίας κατά την υλοποίηση πειραμάτων σε ζώα, που όμως προσεγγίζουν την ανθρώπινη φυσιολογία και παθολογία²². Καταλαβαίνουμε επίσης πως οι μύες έχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται στις αντίξοες συνθήκες θερμοκρασίας, μέσω αυτού του πολύπλοκου

μηχανισμού θερμορύθμισης. Το γεγονός ότι οι μύες απέκτησαν εξελικτικά αυτήν την ικανότητα, επιδεικνύει τη σημασία της θερμοκρασίας τους στην φυσιολογία τους.

1.1.2 Υγρασία Περιβάλλοντος

Οι διεθνείς οδηγίες για τη στέγαση εργαστηριακών μυών ορίζουν ότι η σχετική υγρασία περιβάλλοντος επιβάλλεται να έχει τιμές εντός του εύρους 30-70%. Αυτή η τοποθέτηση αφορά περισσότερο από την μια πλευρά ότι δεν θα διαβρωθεί η τροφή και δεν θα προκληθούν φλεγμονές δέρματος (συμβαίνουν σε χαμηλές τιμές υγρασίας) και από την άλλη ότι τα ζώα προστατεύονται από ερεθισμούς δέρματος και αναπνευστικού συστήματος (σε υψηλές τιμές υγρασίας). Ωστόσο η επίδραση των μικρών αλλαγών της σχετικής υγρασίας στον οργανισμό των τρωκτικών δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Σε πείραμα όπου μύες μεταφέρονταν από περιβάλλον με την συνιστώμενη σχετική υγρασία σε περιβάλλοντα περισσότερο στεγνά, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κατανάλωση τροφής και νερού. Αντιθέτως η μεταφορά σε περιβάλλον με μεγαλύτερη υγρασία συνοδεύτηκε από μειωμένη κατανάλωση τροφής αλλά και ανεπτυγμένο λιπώδη ιστό σε περιοχή γύρω από τις γονάδες, ενώ σχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα παχυσαρκίας. Επειδή η επαναφορά στις συνήθεις συνθήκες κατανάλωσης τροφής επήλθε γρήγορα, μέσα σε δύο μέρες από την έκθεση σε τροποποιημένες συνθήκες υγρασίας, γίνεται κατανοητό πως παρά τις αλλαγές αυτές στη φυσιολογία, οι μύες διαθέτουν έναν εκπληκτικό μηχανισμό προσαρμοστικότητας, αν και θα ήταν χρήσιμο αν υπήρχε εμπεριστατωμένη άποψη σχετικά με τα αποτελέσματα της χρόνιας έκθεσης σε υψηλές/χαμηλές συνθήκες υγρασίας²³.

1.1.3 Επίπεδα Αμμωνίας

Η αμμωνία είναι ένα αέριο που παράγεται κατά την διάσπαση της ουρίας σε νερό και αμμωνία από το ένζυμο ουρεάση και απελευθερώνεται με τα ούρα των τρωκτικών. Το ανώτατο όριο έκθεσης των ανθρώπων σε αμμωνία έχει καθοριστεί στα 25 ppm σε διάρκεια 8 ωρών, καθώς η υπερβολική έκθεση ενέχει συνέπειες στην υγεία του προσωπικού. Ωστόσο δεν έχουν ακόμα καθοριστεί ποια είναι τα ανώτατα επίπεδα αμμωνίας, πέρα από τα οποία επιβαρύνεται η υγεία των τρωκτικών. Η έκθεση μυών σε επίπεδα αμμωνίας 50-150 ppm σε μια διάρκεια 9 ημερών δεν έδειξε κλινικές εκδηλώσεις νόσου. Ομοίως, μύες που είχαν υποβληθεί σε περιβάλλον με επίπεδα αμμωνίας που κυμαίνονταν από 500 σε 700 ppm για περίοδο 7 ημερών, δεν εκδήλωσαν ιδιαίτερη επιβάρυνση στην υγεία τους²⁴. Τέλος, σε δοκιμασία προτιμήσεων, στην οποία μύες υπεβλήθησαν σε διαμερίσματα με διαφορετική συγκέντρωση αμμωνίας, δεν καταγράφηκε προτίμηση σε χαμηλά επίπεδα αμμωνίας στην ατμόσφαιρα, κάτι που προτείνει ότι οι μύες επιδεικνύουν ανοχή σε υψηλή αμμωνία²⁵. Ωστόσο τα παραπάνω δεν πιστοποιούν ότι η αμμωνία δεν επιδρά στον οργανισμό των μυών, καθώς φαίνεται πως ο βαθμός της επίδρασης έχει να κάνει εκτός από τα επίπεδα έκθεσης σε αμμωνία, με τη διάρκεια της έκθεσης. Μύες που είχαν εκτεθεί σε περιβάλλον με συγκέντρωση αμμωνίας 181 ppm για 18 ημέρες, ανέπτυξαν ρινικές επιπλοκές σε επίπεδο ιστών. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από την καθημερινή εξάωρη έκθεση μυών σε 300 ppm αμμωνίας για 5 με 10 ημέρες²⁶.

1.2 Εμπλουτισμός περιβάλλοντος

Η έννοια του εμπλουτισμού περιβάλλοντος λαμβάνει ποικίλες διαστάσεις και προσαρμόζεται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το αντικείμενο των ερευνών. Κατά βάση, ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος είναι η οποιαδήποτε τροποποίηση των συνθηκών περιβάλλοντος, στο οποίο διαβιών ζώα του εργαστηρίου, με στόχο την βελτιστοποίηση της υγείας τους. Ωστόσο, κρίνεται σημαντικό να διερευνάται και να αποσαφηνίζεται περαιτέρω ο όρος κάθε φορά που χρησιμοποιείται, όπως αναφέρουν οι Ratuski και Weary, αυτό γιατί είναι πολλές οι μέθοδοι εμπλουτισμού που έχουν περιγραφεί²⁷. Σε αυτό το σημείο, είναι καίριο να διευκρινιστεί ότι ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος δεν αφορά σε οποιαδήποτε τροποποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλά μόνο σε εκείνες που είναι ωφέλιμες για τα ζώα. Σε αντίθετη περίπτωση, κάνουμε λόγο για τον “ψευδοεμπλουτισμό”, ο οποίος όχι μόνο δεν ωφελεί, αλλά ζημιώνει τα ζώα εργαστηρίου²⁸. Θεμελιώδεις στόχοι του εμπλουτισμού περιβάλλοντος είναι η εκδήλωση φυσιολογικών για τα ζώα συμπεριφορών, η εξασφάλιση βέλτιστης βιολογικής λειτουργίας, σε σωματικό, κοινωνικό και συναισθηματικό επίπεδο, η μείωση των στερεοτυπικών συμπεριφορών και η γενικευμένη υγεία και ευεξία των ζώων. Τα παραπάνω διασφαλίζουν, αφενός την αξιοποίηση των ζώων με ηθικό τρόπο σε ερευνητικές διαδικασίες και αφετέρου την βελτιστοποίηση της απόδοσης των ερευνητικών αποτελεσμάτων. Η στέγαση των εργαστηριακών τρωκτικών σε συμβατικές συνθήκες κρίνεται επιβλαβής για την υγεία τους, καθώς έχει προταθεί ότι συνεπικουρεί σε αύξηση άγχους και εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, κάτι που επισημαίνει ότι η αξία του εμπλουτισμού περιβάλλοντος είναι αναμφισβήτητη.

Ωστόσο στα περισσότερα πειράματα βιοϊατρικού ενδιαφέροντος, οι εργαστηριακοί μύες στεγάζονται υπό μη εμπλουτισμένες, συμβατικές συνθήκες περιβάλλοντος. Οι συμβατικές συνθήκες στέγασης των εργαστηριακών μυών αφορούν τη χρήση καθαρών κλουβιών, στα οποία προστίθεται στρωμένη. Τα κλουβιά είναι κατασκευασμένα με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει μια θέση για την τροφή και μια θέση για την παροχή νερού. Στις μονάδες διαχείρισης εργαστηριακών ζώων πραγματοποιείται τακτικά καθαρισμός των κλουβιών και παρέχεται τροφή, όποτε εκείνη βρίσκεται σε έλλειψη. Καθώς οι παραπάνω ανάγκες των μυών φροντίζονται από το προσωπικό διαχείρισης, οι μύες απομένουν με πλεόνασμα ελεύθερου χρόνου. Σε συνδυασμό με τις λίγες ευκαιρίες για κοινωνική αλληλεπίδραση, που προκύπτει από το κατ’ ανάγκη περιοριστικό περιβάλλον του κλουβιού, συχνά οι μύες απομένουν με αίσθημα πλήξης και εκδηλώνουν αδρανείς συμπεριφορές^{29,30}. Μάλιστα, σε έρευνα παρατηρήθηκε πως η διαβίωση σε μη εμπλουτισμένα κλουβιά είναι πιο πιθανό να επάγει μια συμπεριφορά αδράνειας (Inactive but alive, IBA) σε σχέση με τη διαβίωση σε εμπλουτισμένα κλουβιά. Ενδιαφέρον έχει επίσης, πως αφού μεταφέρθηκαν μύες από εμπλουτισμένο σε μη εμπλουτισμένο περιβάλλον, εκδήλωσαν αυξημένη συμπεριφορά IBA, η οποία δεν διορθώθηκε ακόμα και μετά τη χορήγηση αντικαταθλιπτικού φαρμάκου (βενφλαξίνη)³¹.

Έχουν περιγραφεί πολυάριθμες μέθοδοι για την επίτευξη εμπλουτισμού περιβάλλοντος, μερικές από τις οποίες ερευνώνται συστηματικά, π.χ. το υλικό ένθεσης (nesting material), η συνύπαρξη με άλλα ζώα (social housing), η χρήση αντικειμένων/παιχνιδιών, αλλά και άλλες μέθοδοι που σπάνια εξετάζονται, π.χ. ακουστικός εμπλουτισμός, κατάλληλος φωτισμός, συχνή σύσταση σε καινοτομία.

1.2.1 Υλικό για τη σύνθεση φωλιάς (Nesting Material)

Η τάση των ποντικών να φτιάχνουν φωλιές αποτελεί φυσιολογική συμπεριφορά τους. Ο σχηματισμός φωλιάς κρίνεται πολύ σημαντικός για την ικανότητα αναπαραγωγής και, μετ' έπειτα, τον τοκετό, παράλληλα όμως παρέχει στους μύες προστασία από εξωτερικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, την ικανότητα θερμορύθμισης και ενισχύει την ποιότητα του ύπνου³². Μάλιστα η ένθεση υλικού για σχηματισμό φωλιάς, είναι η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος εμπλουτισμού περιβάλλοντος, καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι φέρει πολλαπλά οφέλη στην υγεία των εργαστηριακών μυών.

Ο σχηματισμός φωλιάς, μέσα στην οποία επιβιώνουν οι μύες, αποτελεί μηχανισμό θερμορύθμισης, όταν η περιβαλλοντική θερμοκρασία είναι χαμηλή. Με την παροχή υλικού στα κλουβιά, το οποίο μπορεί να μετασχηματιστεί εύκολα σε φωλιές, εξασφαλίζεται η ικανότητα θερμορύθμισης στους μύες και κατ' επέκταση, η καλύτερη βιολογική λειτουργία τους. Έχει προταθεί, πως η προσθήκη υλικών σύνθεσης φωλιάς σε περιβάλλον με χαμηλότερη τιμή θερμοκρασίας από τη βέλτιστη, είναι περισσότερο ωφέλιμη για τη θερμορύθμιση, σε σχέση με τη στέγαση σε κλουβιά χωρίς υλικά φωλιάς και με θερμοκρασία θερμο-ουδετερότητας¹⁰. Αυτό οφείλεται στην δυνατότητα που παρέχεται στους μύες, να προσαρμόζουν το μικροπεριβάλλον τους ανάλογα με τις θερμικές τους ανάγκες, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με το είδος, με το φύλο ακόμα και μέσα στο 24ωρο^{10 33}. Όπως περιγράφηκε από τους Gaskill et. al, σε πείραμα με σκοπό την παρατήρηση των προτιμήσεων των μυών μεταξύ περιβάλλοντος με υλικό ένθεσης (Nesting Cage, NC) και περιβάλλοντος με ευνοϊκή θερμοκρασία και χωρίς υλικό ένθεσης (Temperature Cage, TC), οι μύες του στελέχους C57Bl/6 προτίμησαν να μεταφέρουν υλικό φωλιάς από το NC στο TC ώστε να συνδυάσουν ευνοϊκές θερμοκρασίες και παρουσία υλικού φωλιάς, οι μύες BALB/c προτίμησαν ως επί το πλείστον να παραμείνουν στο NC, ενώ οι μύες CD-1 είχαν διαφορετικές προτιμήσεις, ανάλογα με την ποσότητα του παρόντος υλικού φωλιάς στο NC και την τιμή της θερμοκρασίας στο TC. Αναφορικά με τη συσχέτιση του φύλου και των προτιμήσεων των μυών, αποδείχθη ότι οι θηλυκοί μύες αρέσκονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 29°C) και οι αρσενικοί σε χαμηλότερες (μεταξύ 23°C και 26°C), κάτι που ενδεχομένως σχετίζεται με τη διαφορετική βιολογική λειτουργία των ορμονών του φύλου και τη διακύμανση στο σωματικό βάρος ανάμεσα στα δύο φύλα³².

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αύξηση της θερμοκρασίας των κλουβιών καταπολεμά το θερμικό στρες των μυών, δύνανται να τροποποιήσει με αρνητικό τρόπο τη συμπεριφορά τους, αυξάνοντας την επιθετικότητα σε αρσενικούς μύες, αλλά και να δημιουργήσει ένα ασφυκτικό περιβάλλον εργασίας στο προσωπικό διαχείρισης των ζώων⁸. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας των κλουβιών στους 23-25°C για ποντίκια που στεγάζονται μόνα τους και στους 20-23°C βαθμούς για ποντίκια σε συλλογική στέγαση, εκτιμάται πως είναι πιο αντιπροσωπευτική κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων που επιχειρούν να προσεγγίσουν την ανθρώπινη φυσιολογία³⁴.

Η προσθήκη υλικού σύνθεσης φωλιάς έδειξε να αυξάνει τις ευκαιρίες αναπαραγωγής στους μύες. Σε έρευνα αποδείχθη ο θετικός αντίκτυπος των υλικών ένθεσης στην ικανότητα αναπαραγωγής σε μύες χωρίς τρίχωμα. Αυτοί οι μύες στερούνται θερμομόνωσης από τη φύση τους, επομένως κατασκευάζουν φωλιές. Μετρήθηκαν περισσότερα νεογνά σε κλουβιά με μύες που είχαν υλικό φωλιάς σε σχέση με τα κλουβιά χωρίς υλικό. Το συμπέρασμα είναι ότι το υλικό φαίνεται να δημιουργεί καλύτερης ποιότητας φωλιές, παρέχοντας αυξημένα ενεργειακά αποθέματα σε θηλυκούς μύες, έτσι

αυξάνονται οι ευκαιρίες αναπαραγωγής, αλλά και μετά τη γέννηση, τα νεογνά φροντίζονται περισσότερο³⁵.

Μύες που στεγάζονταν σε περιβάλλοντα με υλικό φωλιάς, κατά τη διάρκεια συμπεριφορικών πειραμάτων έδειξαν μειωμένα επίπεδα άγχους. Την ίδια στιγμή, μύες που στεγάζονταν σε περιβάλλοντα χωρίς υλικά φωλιάς, εμφάνισαν μειωμένη απόδοση εκμάθησης και μνήμης³⁶.

Η επιλογή του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί, καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τόσο τη προθυμία των μυών να φτιάξουν φωλιές όσο και την ποιότητα της φωλιάς. Οι μύες επιδεικνύουν προτίμηση σε υλικά που προσεγγίζουν τη φύση τους, υλικά που δεν έχουν έντονες οσμές ή χρώματα. Υπάρχουν πολλά είδη υλικών για σύνθεση φωλιάς που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Παρακάτω αναλύονται μερικά από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα.

- **Φύλλα χαρτιού (tissue paper):** Πρόκειται για ένα οικονομικό και εύκολα προσβάσιμο υλικό σχηματισμού φωλιάς. Είναι σημαντικό τα φύλλα χαρτιού να είναι αποστειρωμένα πριν τοποθετηθούν στο κλουβί (Εικόνα 1). Μπορεί λόγω του χαμηλού κόστους του υλικού να είναι εκτεταμένη η χρήση του, όμως έχει προταθεί ότι οι μύες δεν κατασκευάζουν ικανοποιητικές φωλιές μόνο με τα φύλλα χαρτιού. Η χρήση τους στο κλουβί φαίνεται όμως να συνδράμει στον σχηματισμό φωλιάς, όταν συνοδεύει κάποιο άλλο υλικό εμπλουτισμού. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα φύλλα χαρτιού διαθέτουν κάποια προσφιλή προς τους μύες χαρακτηριστικά, για παράδειγμα είναι εύκολο να τεμαχιστούν^{37 38}. Τα φύλλα χαρτιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ρουτίνα ως δείκτης για την αξιολόγηση της κατάστασης των μυών. Προτείνεται να τοποθετείται ένα φύλλο χαρτιού πάνω από τη μεταλλική σχάρα του κλουβιού. Ένα υγιές ζώο θα τραβήξει το φύλλο χαρτιού στο κλουβί μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα. Σε αντίθετη περίπτωση, το προσωπικό διαχείρισης των εργαστηριακών ζώων καλείται να αφιερώσει περισσότερο χρόνο στην παρατήρηση του ζώου³⁹.



Εικόνα 1: Φύλλα χαρτιού ως υλικό σύνθεσης φωλιάς³⁷.

- **Κομμάτια από τεμαχισμένο χαρτί (shredded paper strips):** Το συγκεκριμένο υλικό φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ελκυστικό στους μύες, καθώς προσομοιάζει στο φυσικό τους περιβάλλον και μπορεί με μεγαλύτερη επάρκεια να επεξεργαστεί, σύμφωνα με τις ανάγκες των ζώων (Εικόνα 2). Για το λόγο αυτό, συνήθως μύες που στεγάζονται με το συγκεκριμένο υλικό εμπλουτισμού, δημιουργούν περισσότερο ποιοτικές φωλιές³⁷.



Εικόνα 2: Κομμάτια από τεμαχισμένο χαρτί σε συνδυασμό με φύλλο χαρτιού.

- **Υλικό από βαμβάκι:** Τέτοια υλικά μπορεί να είναι κύλινδροι από βαμβάκι (cotton rolls) ή τετράγωνα κομμάτια από βαμβάκι (nestlets/compressed cotton squares). Και μεν τέτοια υλικά χρησιμοποιούνται από τους μύες, ωστόσο δίνουν λιγότερες φωλιές και όχι τόσο καλές σε σχέση με τα παραπάνω υλικά^{36 37}. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε υλικά από βαμβάκι είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα εγκλωβισμού των μυών και τραυματισμού των άκρων τους, κάτι που δεν είναι θεμιτό ούτε από άποψη ηθικής, αλλά ούτε και για την έκβαση των πειραμάτων (Εικόνα 3)⁴⁰.



Εικόνα 3: Υλικό δημιουργίας φωλιάς από βαμβάκι και μυς με τραυματισμένο άκρο από κύλινδρο από βαμβάκι, καταλήγοντας σε εκδήλωση οιδήματος³⁹.

1.2.2 Καλύμματα και σπίτια για τρωκτικά

Ιδιαίτερα διαδεδομένα όσο αφορά τον εμπλουτισμό περιβάλλοντος είναι τα καλύμματα και σπίτια για τρωκτικά, ευρέως γνωστά ως *mouse houses* ή *mouse igloos* (Εικόνα 4). Κατασκευάζονται από πλαστικό υλικό, κατάλληλο για κλιβανισμό, συνήθως κόκκινου χρώματος. Προστατεύουν από το φως μεγάλης έντασης, επιτρέποντας στους μύες να κοιμούνται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Παράλληλα τα τοιχώματα έχουν επαρκή διαύγεια ώστε να καθιστούν εφικτή την επιτήρηση των ζώων από το προσωπικό φροντίδας, χωρίς αυτά να ενοχλούνται. Εκτός από πλαστικά, υπάρχουν και ξύλινα καλύμματα (*wooden blocks*). Από τη μια πλευρά παρέχουν στους μύες τη δυνατότητα να

μασάνε τις επιφάνειες του καλύμματος, ενισχύοντας τις φυσικές συμπεριφορές τους. Από την άλλη, αυξάνουν το κόστος, καθώς χρειάζονται συχνότερη αντικατάσταση σε σχέση με τα πλαστικά καλύμματα. Ακόμα υπάρχουν και τα καλύμματα που κατασκευάζονται από υλικά σχηματισμού φωλιάς (*disposable nest boxes, shelters*), επιτρέποντας την τροποποίηση τους από τα τρωκτικά, αν και πάλι τίθεται το θέμα του κόστους⁴¹.



Εικόνα 4: Παραδείγματα καλυμμάτων για τρωκτικά. (α) *Mouse igloo*. (β) Καλύμματα - tunnels διαφόρων χρωμάτων. (γ) Ξύλινο κάλυμμα (*wooden house*). (δ) *Nest box*.

1.2.3 Συλλογική Στέγαση (Social/Group Housing)

Μια άλλη μέθοδος εμπλουτισμού περιβάλλοντος, ευρέως χρησιμοποιούμενη και με πολλαπλά οφέλη, είναι η συλλογική στέγαση των μυών. Καθώς οι μύες είναι οργανισμοί που ζουν συλλογικά από τη φύση τους, δημιουργώντας αποικίες με ένα αρσενικό, μερικά θηλυκά και τους απογόνους τους, αναμενόμενο είναι να στεγάζονται συλλογικά και σε εργαστηριακές συνθήκες, προκειμένου να ενισχυθεί η φυσική τους συμπεριφορά⁴². Ωστόσο, συχνό φαινόμενο είναι να στεγάζονται εργαστηριακοί μύες μεμονωμένα σε κλουβιά στις μονάδες διαχείρισης ζώων. Πρόκειται για κάτι που επιφέρει αρνητικό αντίκτυπο στη φυσιολογία των μυών, καθώς προκαλεί χρόνια στρες. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης στο αίμα, μειωμένα επίπεδα παράγοντα BDNF (Brain derived neurotrophic factor, μια νευροτροπίνη με αντικαταθλιπτικές ιδιότητες) αλλά και γενική εικόνα χρόνιου άγχους όπως έδειξαν αποτελέσματα από συμπεριφορικά πειράματα (*Open Field, Elevated Plus Maze, Forced Swim Test, Social Interaction Test*) σε μύες που στεγάζονταν μεμονωμένα, σε σχέση με μύες που στεγάζονταν συλλογικά⁴³. Ακόμα και αν το ανοσολογικό προφίλ δεν μεταβάλλεται σε συνθήκες μεμονωμένης και συλλογικής στέγασης, μετά από πρόκληση ήπιου στρες, μύες που διαβιούν μονήρη έδειξαν μειωμένα επίπεδα ιντερλευκινών 1 και 2 (IL-1, IL-2)⁴⁴, κάτι που αξίζει να εκτιμάται όταν καθημερινά οι μύες μιας μονάδας

δέχονται στρεσογόνα ερεθίσματα. Επιπλέον η συλλογική στέγαση έδειξε πιο γρήγορη μετα-χειρουργική ανάρρωση, σε σχέση με τη μεμονωμένη, κάτι που επίσης είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη στην *in vivo* πειραματική ρουτίνα⁴⁵. Αν και δεν παρατηρούνται πάντα διαφορές σε συμπεριφορικές και φυσιολογικές παραμέτρους των μυών που στεγάζονται συλλογικά ή μεμονωμένα⁴⁶, η συλλογική στέγαση είναι μια ιδιαίτερα προσφιλής μέθοδος εμπλουτισμού περιβάλλοντος, διότι παρέχει και το πλεονέκτημα εξοικονόμησης χώρου (θα χρειάζονταν πολλά περισσότερα κλουβιά, εάν η στέγαση γινόταν αποκλειστικά μεμονωμένα).

Στον αντίποδα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η συλλογική στέγαση δύνανται ορισμένες φορές να καταστεί επιζήμια για τους μύες, για παράδειγμα όταν αρσενικού φύλου μύες διαβιούν στο ίδιο κλουβί, ενδέχεται να εκδηλώνονται επιθετικές συμπεριφορές. Πρόκειται για μια τάση εξαρτώμενη από το στέλεχος των μυών, καθώς μύες του στελέχους Swiss είναι σχεδόν συνέχεια επιθετικοί, ενώ του στελέχους BALB/c ανέχονται περισσότερο τους συγκατοίκους του ίδιου φύλου⁴⁷.

1.2.4 Παιχνίδια για τρωκτικά

Με την εισαγωγή τροχών σωματικής άσκησης στο κλουβί των μυών, προάγεται η εθελοντική σωματική άσκηση και όχι η εξαναγκασμένη, προάγοντας σε σημαντικό βαθμό την ευεξία στους μύες. Δύο είδη τροχών χρησιμοποιούνται κυρίως, οι τροχοί υπό κλίση (Εικόνα 5) και οι τροχοί υπό ορθή γωνία (Εικόνα 6). Οι μύες δείχνουν προτίμηση σε τροχούς υπό κλίση, στους οποίους φαίνεται να τρέχουν περισσότερα χιλιόμετρα. Συστήματα καταγραφής της δραστηριότητας των μυών σε τροχούς, δείχνουν ότι περισσότερα χιλιόμετρα διανύονται κατά τις βραδινές ώρες. Οι μύες εκδήλωσαν αυξανόμενη δραστηριότητα τρεξίματος τις πρώτες τρεις εβδομάδες μετά τη σύσταση σε τροχούς, ενώ ακολούθησε μια περίοδος πλατώ (με σταθερή δραστηριότητα) περίπου πέντε εβδομάδων. Περισσότερη και με σημαντική διαφορά είναι η ενασχόληση με τους τροχούς σε θηλυκούς μύες σε σχέση με τους αρσενικούς, όμως η διακύμανση στα χιλιόμετρα που διανύουν οι θηλυκοί μύες από μέρα σε μέρα είναι μεγαλύτερη, κάτι που ενδεχομένως οφείλεται στην επίδραση του κύκλου οίστρου. Η εθελοντική άσκηση επηρεάζει τη φυσιολογία των μυών όχι μόνο στην έκφραση γονιδίων, αλλά έχει θετικό αντίκτυπο σε επίπεδο φαινοτύπου. Παρατηρήθηκε ότι μύες που είχαν στεγαστεί σε κλουβί με τροχούς, εμφάνισαν αυξημένη μιτοχονδριακή λειτουργικότητα σε σκελετικούς μύες, καθώς και αυξημένη καρδιακή μάζα στις 20 ημέρες μετά τη σύσταση με τους τροχούς. Γενικότερα η εθελοντική άσκηση φαίνεται να αναστέλλει σωματικές τροποποιήσεις σχετιζόμενες με τη γήρανση, να αποτρέψει τη σαρκοπενία και να αυξάνει το μέσο προσδόκιμο ζωής έως και 17%⁴⁸. Συχνό τρέξιμο σε τροχούς αυξάνει τη νευρογένεση, ενεργοποιεί μονοπάτια επιβράβευσης στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συνεισφέρει σημαντικά έναντι της κατάθλιψης⁴⁹.

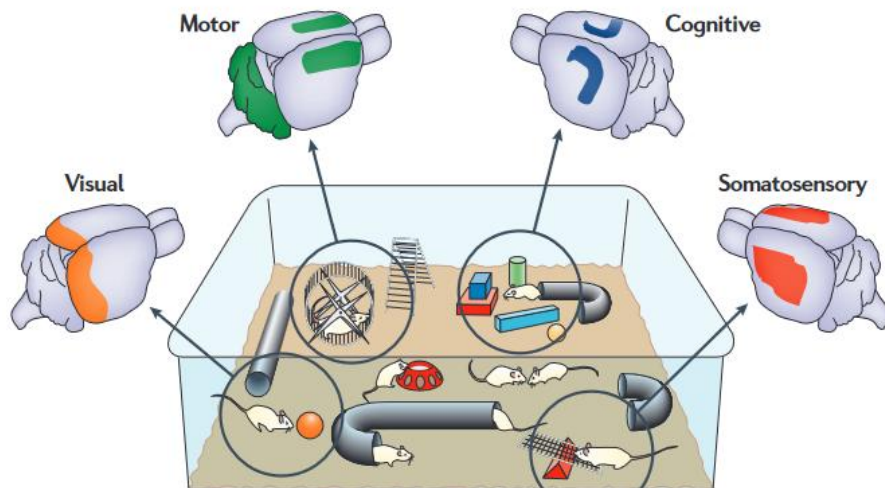


Εικόνα 5: Οριζόντιος τροχός άσκησης, πηγή *Muromachi Kikai Co., Ltd.*



Εικόνα 6: Παράδειγμα εμπλουτισμού περιβάλλοντος, μέθοδος που αφορά την κατασκευή των κλωβών. Αριστερά απεικονίζεται κλωβός στον οποίο στεγάζονται μύες σε συμβατικές συνθήκες στέγασης και δεξιά κλωβός με εσωτερική εγκατάσταση κάθετου τροχού εκγύμνασης. Οι δύο κλωβοί κατασκευάζονται από την ίδια εταιρία, πηγή: *Techniplast*

Ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος που χρησιμοποιεί αντικείμενα για παιχνίδι, παρέχει ερεθίσματα στους μύες, τα οποία είναι ικανά να αναπαράγουν ορισμένες συμπεριφορές και να βοηθήσουν στη διάπλαση ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου. Συνδράμει στην βελτίωση της μνήμης, βοηθάει στην καταπολέμηση του άγχους, ενισχύει συμπεριφορές εξερεύνησης. Τα αντικείμενα εμπλουτισμού διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, τη μυρωδιά, την υφή και κατά συνέπεια διαφέρει ο βαθμός της αλληλεπίδρασης που επιδεικνύουν οι μύες με αυτά. Για να θεωρηθεί επιτυχής η προσθήκη παιχνιδιών στους κλωβούς των μυών, θα πρέπει να παρέχεται το επίπεδο περιπλοκότητας που θα ενεργοποιήσει περιοχές του εγκεφάλου αλλά και η συχνότητα μετακίνησης, αλλαγής των αντικειμένων και σύστασης σε καινούργια, ώστε να υπάρχει θετική ανταπόκριση από τα ζώα. Διάφορα μοντέλα εμπλουτισμού έχουν χρησιμοποιηθεί σε μύες που έπασχαν από νευρολογικές ασθένειες, όπως νόσο Alzheimer, νόσο Huntington, νόσο Parkinson, επιληψία, σύνδρομο Down, τραυματισμό εγκεφάλου, με σκοπό να προσεγγίσουν την παθοφυσιολογία των ασθενειών και να επιτύχουν βελτίωση της κλινικής εικόνας⁵⁰. Συνήθως αυτά τα μοντέλα χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο ενός υπερ-εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, όπου ζώα στεγάζονται σε κλωβούς μεγαλύτερων διαστάσεων για να υπάρχει αρκετός χώρος, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντικείμενα και για μικρότερους κλωβούς, καθώς υπάρχουν πρωτόκολλα που το επιτρέπουν^{51,52}. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα αντικείμενα να έχουν αποστειρωθεί πριν την τοποθέτηση στο κλουβί, τα ζώα να επιτηρούνται σε καθημερινή βάση και να ελέγχονται για ενδείξεις άγχους και σημάδια τραυματισμού.



Εικόνα 7: Ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος παρέχει οπτικά, κινητικά, γνωστικά και σωματοαισθητικά ερεθίσματα, τα οποία συνδέονται με την ανάπτυξη περιοχών του εγκεφάλου (ινιακός λοβός, παρεγκεφαλίδα, ιπποπόκαμπος, τμήματα του μεταιχμιακού συστήματος)⁴⁹.



Εικόνα 8: Συνθήκες υπερ-εμπλουτισμού. Σε εμβαδόν 120 cm x 90 cm έχουν τοποθετηθεί δύο τροποποιημένοι κλωβοί με ανοίγματα για την ελεύθερη διέλευση, τροχοί, καλύμματα (*mouse igloo*), πλαστικό τούνελ, ξύλινο παιχνίδι⁵⁰.

1.2.5 Ενίσχυση όγκου στρωμνής (Enrichment in bedding volume)

Η συνήθης ποσότητα στρωμνής σε κλουβιά στέγασης τρωκτικών είναι περίπου 0,5 λίτρα (ύψος περίπου 0,5 με 1 εκατοστά). Τα τρωκτικά χρησιμοποιούν τη στρωμνή για να εκφράσουν φυσικές συμπεριφορές, όπως το σκάψιμο και το κρύψιμο. Με τον τρόπο αυτό, ιδιαίτερα οι μύες, τροποποιούν το μικροπεριβάλλον τους και επιτυγχάνεται τόσο η θερμομόνωση όσο και η προστασία από πιθανούς εξωτερικούς κινδύνους⁵³. Υπάρχουν διάφορα είδη στρωμνής, αποτελούμενη από μικρά σωματίδια (π.χ. πριονίδι - sawdust) ή

μεγαλύτερα (π.χ. ροκανίδι - shavings). Το ερώτημα για το ποιο είναι το περισσότερο ωφέλιμο είδος στρωμνής, είναι κάτι που δεν απασχολεί τη συγκεκριμένη εργασία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η επίδραση της ποσότητας χρησιμοποιούμενης στα κλουβιά στρωμνής. Έχει προταθεί ότι η αύξηση αυτής δημιουργεί ένα περιβάλλον στέγασης που προσομοιάζει περισσότερο στις φυσικές συνθήκες των τρωκτικών, καθώς παρέχει περισσότερες ευκαιρίες έκφρασης των παραπάνω συμπεριφορών. Αυτό καθιστά την ενίσχυση της στρωμνής, μια μέθοδο εμπλουτισμού περιβάλλοντος.

Όταν μύες στελέχους C57Bl/6 και BALB/c υπεβλήθησαν σε κλουβιά με στρωμνή όγκου 0,5, 1,5 και 6 λίτρων, καταγράφηκε προτίμηση στη στέγαση σε συνθήκες με περισσότερη στρωμνή, με τους συγγραφείς να προτείνουν αύξηση στην χρησιμοποιούμενη στρωμνή ειδικά σε πειράματα που αποκλείονται άλλες μέθοδοι εμπλουτισμού⁵⁴. Η μείωση στο βάρος οργάνων που σχετίζονται με τη θερμορύθμιση, όπως ήπαρ, επινεφρίδια, νεφροί και καρδιά και μήκος ουράς, σε μύες που στεγάζονταν σε κλουβιά με μεγαλύτερη ποσότητα στρωμνής, υποδηλώνει ότι δεν χρειάστηκε να γίνει θερμορύθμιση και αποδεικνύει το θερμομονωτικό πλεονέκτημα της αυξημένης στρωμνής⁵⁵.

Σε μικρότερο βαθμό έχει παρατηρηθεί και επίδραση της ποσότητας στρωμνής στα επίπεδα αμμωνίας μέσα στο κλουβί. Μειωμένη στρωμνή έδειξε μεγαλύτερα επίπεδα αμμωνίας κλουβιού σε σχέση με την αυξημένη στρωμνή, σε μετρήσεις που έγιναν την ίδια μέρα⁵⁶. Αυτό δηλώνει ότι η αυξημένη ποσότητα στρωμνής παρέχει μεγαλύτερη απορροφητικότητα, άρα και πιο υγιή ατμόσφαιρα με λιγότερα επίπεδα αμμωνίας. Σε αυτό το σημείο, ενδιαφέρον έχει η συσχέτιση της ποσότητας στρωμνής με την συχνότητα αντικατάστασης των κλουβιών. Κατά την αλλαγή των κλουβιών, οι μύες αλλάζουν περιβάλλον και κατά το διάστημα προσαρμογής στο νέο κλουβί, επηρεάζεται σαφώς η φυσιολογία τους. Εάν η αυξημένη ποσότητα στρωμνής έχει μεγαλύτερη απορροφητικότητα και μειώνει τη συχνότητα αλλαγής κλουβιών, εξασφαλίζει έτσι λιγότερη ενόχληση των ζώων αλλά και μειωμένη έκθεση του προσωπικού σε αλλεργιογόνα, η οποία μακροχρόνια έχει σημαντική αξία.

1.3 Η παρούσα μελέτη

Όπως αναφέρθηκε, ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος περιλαμβάνει μια ευρεία ποικιλία μεθόδων τροποποίησης του περιβάλλοντος στέγασης των μυών. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η ενίσχυση του όγκου στρωμνής ως μέθοδος εμπλουτισμού περιβάλλοντος. Η επιλογή αυτή στοιχειοθετείται από κάποια βασικά επιχειρήματα. Αρχικά η στρωμνή είναι ένα υλικό που υπάρχει σε όλες τις μονάδες διαχείρισης ζώων εργαστηρίου, επομένως είναι εύκολα προσβάσιμο και ενδεχομένως περισσότερο οικονομικό σε σχέση με εξειδικευμένα υλικά εμπλουτισμού. Επιπροσθέτως, οι μύες είναι εξοικειωμένοι με τη στρωμνή, η οποία υπάρχει ήδη στα κλουβιά σε συμβατικές συνθήκες στέγασης. Με αυτόν τον τρόπο αποκλείεται ένας σημαντικός παράγοντας, η σύσταση σε νέα υλικά εμπλουτισμού. Δεν ανταποκρίνονται όλα τα ζώα με τον ίδιο τρόπο σε υλικά εμπλουτισμού περιβάλλοντος, καθώς ενδέχεται να εκδηλώνεται άγχος ή επιθετικότητα όταν οι μύες έρχονται σε επαφή με ένα αντικείμενο “ξένο” ως προς τη φύση τους, κάτι που επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα από τα θεμιτά. Σε σχέση με άλλες μεθόδους εμπλουτισμού, η αυξημένη ποσότητα στρωμνής είναι μια πιο πρακτική μέθοδος και δεν επιβαρύνει την ρουτίνα του προσωπικού με επιπλέον διεργασίες, όπως αποστείρωση υλικών (π.χ. καλύμματα/σπίτια) ή ζύγιση (π.χ. υλικό σύνθεσης φωλιάς) πριν την

τοποθέτηση σε κλουβιά. Ακόμα, η αυξημένη ποσότητα στρωμνής έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως μέθοδος εμπλουτισμού, καθώς όχι μόνο επηρεάζει τον οργανισμό των μυών, αλλά προξενεί αλλαγές και στο περιβάλλον στέγασης, επηρεάζοντας τα επίπεδα αμμωνίας και υγρασίας μέσα στο κλουβί, κάτι που άλλες μέθοδοι εμπλουτισμού δεν επιτυγχάνουν.

Η επίδραση του όγκου στρωμνής στη φυσιολογία των μυών, είναι κάτι που έχει μελετηθεί ξανά. Σκοπός είναι να εξετάσουμε: (1) την αλληλεπίδραση της ποσότητας στρωμνής με τον οργανισμό των μυών, (2) τον ρόλο της ποσότητας στρωμνής στην σχέση κλωβού-δωματίου στέγασης (δηλαδή, αν η ενισχυμένη στρωμνή δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό του κλωβού, ανεπηρέαστο από τις συνθήκες δωματίου στέγασης).

Για το λόγο αυτό στεγάσαμε μύες σε κλουβιά με τη ποσότητα στρωμνής που χρησιμοποιείται υπό κανονικές συνθήκες στη μονάδα (περίπου 0,4 L) και σε κλουβιά με τετραπλάσια ποσότητα στρωμνής (1,6 L), ώστε να δούμε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Υποθέτουμε ότι αυτή η μέθοδος εμπλουτισμού θα εξομαλύνει τα επίπεδα υγρασίας και λόγω μεγαλύτερης απορροφητικότητας θα προσφέρει ένα πιο στεγνό περιβάλλον εντός του κλωβού και ενδεχομένως θα αυξήσει τα επίπεδα θερμοκρασίας λόγω θερμομόνωσης σε κλουβιά με περισσότερη στρωμνή. Ενδέχεται να παρατηρηθεί μικρότερη απαίτηση για αλλαγή των κλουβιών με περισσότερη στρωμνή, σε σχέση με τα κλουβιά με τη συμβατική ποσότητα στρωμνής, μέσα στην ίδια μέρα. Ενώ σε άλλες μελέτες εξετάζονται παράμετροι όπως αιματολογικοί δείκτες και βάρη οργάνων, η ερευνητική ομάδα επέλεξε να παρέμβει ελάχιστα στα ζώα, με τη μέτρηση της θερμοκρασίας σώματος να είναι η πιο “δυσάρεστη” και παρεμβατική διαδικασία.

Όσο αφορά τα χρησιμοποιούμενα ζώα, επιλέχθηκαν αρσενικού και θηλυκού φύλου μύες. Γενικότερα η θερμοκρασία σώματος εμφανίζει μεταβλητότητα μεταξύ των δύο φύλων, οπότε θεωρείται πιο σωστό τα αποτελέσματα να καλύπτουν αυτή τη διακύμανση και να είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά. Άλλωστε η έλλειψη χρήσης θηλυκών μυών στην βιοϊατρική έρευνα αποτελούσε μια χρόνια τάση, παρέχοντας αναμφισβήτητο “sex bias” στα πειραματικά αποτελέσματα, μια πρόκληση την οποία καλείται να αντιμετωπίσει σήμερα η μεταφραστική έρευνα⁵⁷. Μια σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με άλλες μελέτες είναι ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται wildtype μύες καθώς και γενετικά τροποποιημένοι. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται μύες της φυλής 129SV και desmin knock out (de-/de-), οι οποίοι είναι μύες με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο, με τη διαφορά ότι οι δεύτεροι έχουν υποστεί απενεργοποίηση (knockout) του γονιδίου της δεσμίνης.

Λίγα λόγια για τους μύες de-/de- Πρόκειται για γενετικά τροποποιημένους μύες (knock out) με ανενεργό το γονίδιο της δεσμίνης (desmin null). Η δεσμίνη είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε καρδιακό και σκελετικό μυϊκό ιστό. Κατά την πορεία ανάπτυξης των μυών, η δεσμίνη εκφράζεται πριν από άλλες σημαντικές δομικές πρωτεΐνες του μυϊκού ιστού, κάτι που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της στην διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Οι μύες de-/de- αναπτύχθηκαν με σκοπό να μελετηθεί ο ρόλος της δεσμίνης, μέσω της επίδρασης που έχει η έλλειψη της στον οργανισμό. Σημαντικό εύρημα σχετικά με τους de-/de- μύες είναι ότι αναπτύσσουν μειωμένο καρδιακό τόνο, εμφανίζουν εναποθέσεις ασβεστίου στο μυοκάρδιο, στο οποίο συνήθως παρατηρούνται περιοχές

ίνωσης ή και νέκρωσης. Σε επίπεδο κυττάρου, ενδέχεται να εκλείπουν ή να διαφέρουν ως προς την τοποθεσία οι ζώνες Z των σαρκομερών σε καρδιακές μυϊκές ίνες. Αυτές οι ανωμαλίες, παρά το γεγονός ότι είναι περισσότερο εμφανείς στην καρδιά, παρουσιάζονται σε μικρότερο βαθμό και σε σκελετικό μυϊκό ιστό, όπως έδειξαν ιστολογικές αναλύσεις σε δείγματα γλώσσας, μυών του ποδιού και διαφράγματος. Η σημαντική υπεροχή που έχουν οι αλλοιώσεις στον καρδιακό ιστό σε σχέση με τον σκελετικούς μύες, αιτιολογεί ότι η μυοκαρδιοπάθεια είναι το βασικό χαρακτηριστικό των μυών de-/de-, η οποία και εκδηλώνεται κατά τον δεύτερο μήνα της ζωής⁵⁸.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ζώα πειραματισμού

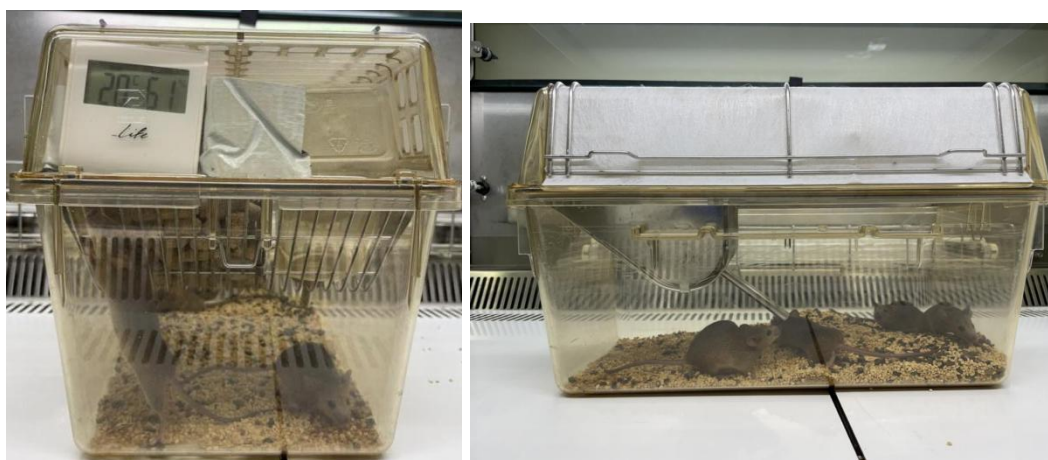
Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 64 μύες, ελεύθεροι ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free - SPF), του στελέχους 129SV (wildtype) και de-/de- (knockout), αρσενικού και θηλυκού φύλου. Στην αρχή του πειράματος, οι μύες βρίσκονταν σε ηλικία 10-12 εβδομάδων και είχαν μέσο βάρος 22-25 g. Από την πειραματική διαδικασία αποκλείστηκαν μύες που είχαν υποστεί χειρουργική παρέμβαση, αλλά και η εμφάνιση αλωπεκίας αποτέλεσε παράγοντας αποκλεισμού, καθώς φαίνεται να μεταβάλλει τις τιμές θερμοκρασίας σώματος⁵⁹. Κάτι που εκτιμήθηκε πριν την έναρξη του πειράματος, ήταν η χρήση ή μη τοπικά ξυρισμένων μυών. Έτσι μετρήθηκε πρώτα η θερμοκρασία σε μη ξυρισμένους μύες καθώς και λίγα λεπτά μετά την αποτρίχωσή τους, με το συμπέρασμα να είναι ότι οι τιμές θερμοκρασίας των δύο μετρήσεων δεν είχαν σημαντική διαφορά. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία προτείνεται να μην γίνεται αποτρίχωση, καθώς ερεθίζεται η περιοχή, υπάρχει ο κίνδυνος φλεγμονής, αυξάνεται η απώλεια θερμότητας και γενικά επηρεάζονται οι τιμές θερμοκρασίας. Καθώς οι μετρήσεις θερμοκρασίας θα ήταν συστηματικές στο συγκεκριμένο πείραμα, εκτιμήθηκε ότι η επαναλαμβανόμενη αποτρίχωση θα επέφερε μεταβλητότητα στα αποτελέσματα⁵⁴.

2.2 Συνθήκες στέγασης

Οι μύες στεγάζονται σε στατικά κλουβιά τύπου II (1284L, Tenchiplast, Italy, Επιφάνεια πυθμένα 530 cm², μήκος 365 mm x πλάτος 207 mm x ύψος 140 mm) με καπάκια με φίλτρο (filter top cages), προκειμένου να προστατεύεται το μικροβιολογικό τους υπόβαθρο. Η φυσιολογία των μυών εξετάζεται ως προς δύο είδη συνθηκών στέγασης:

(1) Στέγαση με χαμηλή ποσότητα στρωμνής: Κλουβιά με καπάκια φίλτρου, στα οποία περιέχονται 200g (400 mL) στρωμνής (Εικόνα 9)

(2) Στέγαση με υψηλή ποσότητα στρωμνής: Κλουβιά με καπάκια φίλτρου, στα οποία περιέχονται 800g (1600 mL) στρωμνής (Εικόνα 10)



Εικόνα 9: Κλωβός με χαμηλή ποσότητα στρωμνής.



Εικόνα 10: Κλωβός με υψηλή ποσότητα στρωμνής.

Τα χρησιμοποιούμενα κλουβιά κλιβανίζονταν μετά τον καθαρισμό τους. Η στρωμνή που χρησιμοποιήθηκε είναι κλιβανισμένο πριονίδι. Για περισσότερη ακρίβεια, ο όγκος στρωμνής μετράται με ογκομετρική φιάλη (2000 mL) προτού γίνει η τοποθέτηση στρωμνής μέσα στα κλουβιά. Τροφή (αποστειρωμένη σε μορφή pellet) και νερό παρέχονταν *ab libitum*.

Για την ομαλή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, κρίθηκαν αναγκαίες ορισμένες μεταβολές στην κατασκευή του κλωβού. Εν πρώτοις τοποθετήθηκαν αισθητήρες θερμοκρασίας και υγρασίας στην εσωτερική πτυχή του filter top με συγκολλήθηκαν με ταινία (Εικόνα 11). Η θέση τους ήταν πάνω από την ταϊστρα, προκειμένου να μην διαβρώνονται από τους μύες. Στους κλωβούς με ενισχυμένη στρωμνή, το στόμιο από το μπουκάλι νερού εφάπτονταν με την ανώτερη επιφάνεια της στρωμνής, με αποτέλεσμα το νερό να διαχέεται, το μπουκάλι να αδειάζει και να απομένουν βρέχεται το εσωτερικό του κλωβού. Προς επίλυση αυτού του προβλήματος, λυγίσαμε τη σχάρα του κλωβού πάνω από τη θέση τοποθέτησης του μπουκαλιού, έτσι ώστε να εισάγεται σε θέση που να μην υπάρχει επαφή του στομίου με τη στρωμνή (Εικόνα 12).



Εικόνα 11: Filter top με ενσωματωμένο αισθητήρα θερμοκρασίας και υγρασίας.



Εικόνα 12: Τροποποιημένη σχάρα του κλωβού, με σκοπό την τοποθέτηση του μπουκαλιού νερού σε ανυψωμένη θέση.

Όλα τα κλουβιά βρίσκονταν στο ίδιο δωμάτιο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, στο οποίο η μέση θερμοκρασία ανέρχονταν στους 22-23°C, με σχετική υγρασία 60%. Ο κύκλος φωτός-σκότους είναι ρυθμισμένος σε 12 ώρες φωτός : 12 ώρες σκότους, με τεχνητό φωτισμό και τα φώτα να ανοίγουν καθημερινά στις 7 π.μ.

2.3 Πειραματικός σχεδιασμός

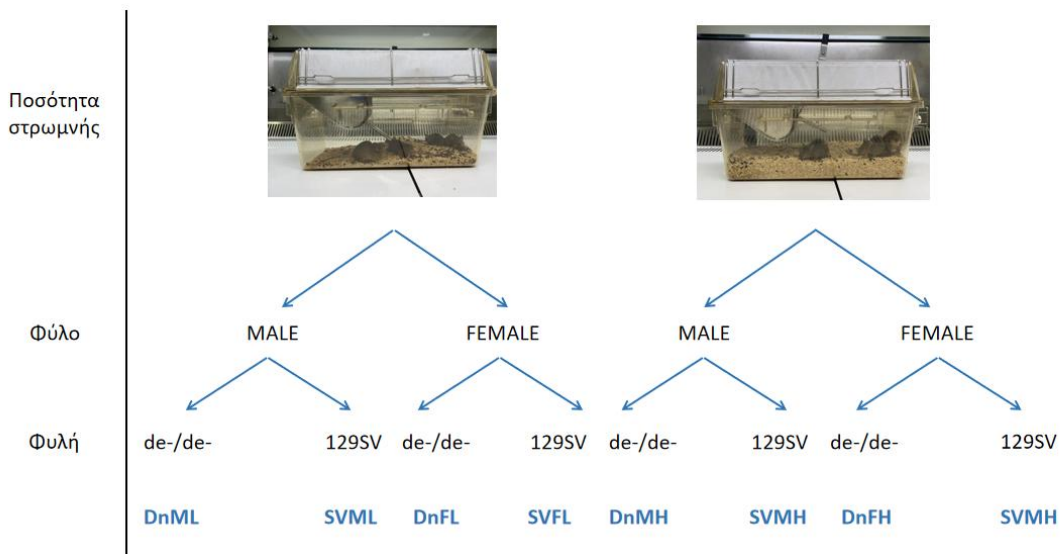
Στεγάζουμε μύες δύο διαφορετικών στελεχών, δύο φύλων και δύο διαφορετικές συνθήκες, κατηγοριοποιώντας τους σε 8 ομάδες (2 γονότυποι x 2 φύλα x 2 συνθήκες στέγασης = 8 ομάδες). Μονάδα πειραματισμού αποτελεί το κλουβί, καθώς ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος είναι μια θεραπεία που εφαρμόζεται σε επίπεδο κλουβιού. Υπολογίσαμε τον αριθμό των ζώων *a priori* χρησιμοποιώντας μέθοδο ανάλυσης one-way ANOVA, από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης *G*Power* (Εικόνα 13). Θέτοντας ως effect size (μια βιολογικά σημαντική διαφορά στην κύρια μέτρηση, που είναι η θερμοκρασία σώματος των μυών) 0,5°C, όπως ακριβώς και σε παρόμοια μελέτη¹⁰, 0,80 ως δύναμη και 0,05 ως συντελεστή σημαντικότητας, υπολογίσαμε πως θα χρησιμοποιηθούν συνολικά 64 ζώα. Μετά την κατηγοριοποίηση των ζώων, καταλήξαμε στην χρήση 4 ζώων ανά ομάδα πειραματισμού, επομένως στεγάζονται 4 μύες σε κάθε κλουβί. Άλλωστε και σε παρόμοια πειράματα, χρησιμοποιούνται 3-5 μύες ανά κλουβί^{10 36}. Ο πληθυσμός (sample size) που είναι ο συνολικός αριθμός των μονάδων πειραματισμού, είναι 16 κλουβιά, με αποτέλεσμα κάθε ομάδα να έχει 2 κλουβιά (μια επανάληψη του πειράματος σε κάθε ομάδα). Συνεπώς το πείραμα υλοποιήθηκε σε δύο φάσεις.

F tests – ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way		
Analysis:	A priori: Compute required sample size	
Input:	Effect size f	= 0.5
	α err prob	= 0.05
	Power (1- β err prob)	= 0.79
	Number of groups	= 8
Output:	Noncentrality parameter λ	= 16.0000000
	Critical F	= 2.1781556
	Numerator df	= 7
	Denominator df	= 56
	Total sample size	= 64
	Actual power	= 0.7934839

Εικόνα 13: Υπολογισμός του πληθυσμού των μυών, που θα χρησιμοποιηθούν στην πειραματική διαδικασία, μέσω του προγράμματος *G*Power*.

Παρακάτω ακολουθεί η ταξινόμηση και κωδικοποίηση των ομάδων πειραματισμού (Σχεδιάγραμμα 1):

- 1) de-/de- αρσενικά σε κλωβούς με χαμηλή ποσότητα στρωμνής (DnML)
- 2) de-/de- θηλυκά σε κλωβούς με χαμηλή ποσότητα στρωμνής (DnFL)
- 3) de-/de- αρσενικά σε κλωβούς με υψηλή ποσότητα στρωμνής (DnMH)
- 4) de-/de- θηλυκά σε κλωβούς με υψηλή ποσότητα στρωμνής (DnFH)
- 5) 129SV αρσενικά σε κλωβούς με χαμηλή ποσότητα στρωμνής (SVML)
- 6) 129SV θηλυκά σε κλωβούς με χαμηλή ποσότητα στρωμνής (SVFL)
- 7) 129SV αρσενικά σε κλωβούς με υψηλή ποσότητα στρωμνής (SVMH)
- 8) 129SV θηλυκά σε κλωβούς με υψηλή ποσότητα στρωμνής (SVFH)

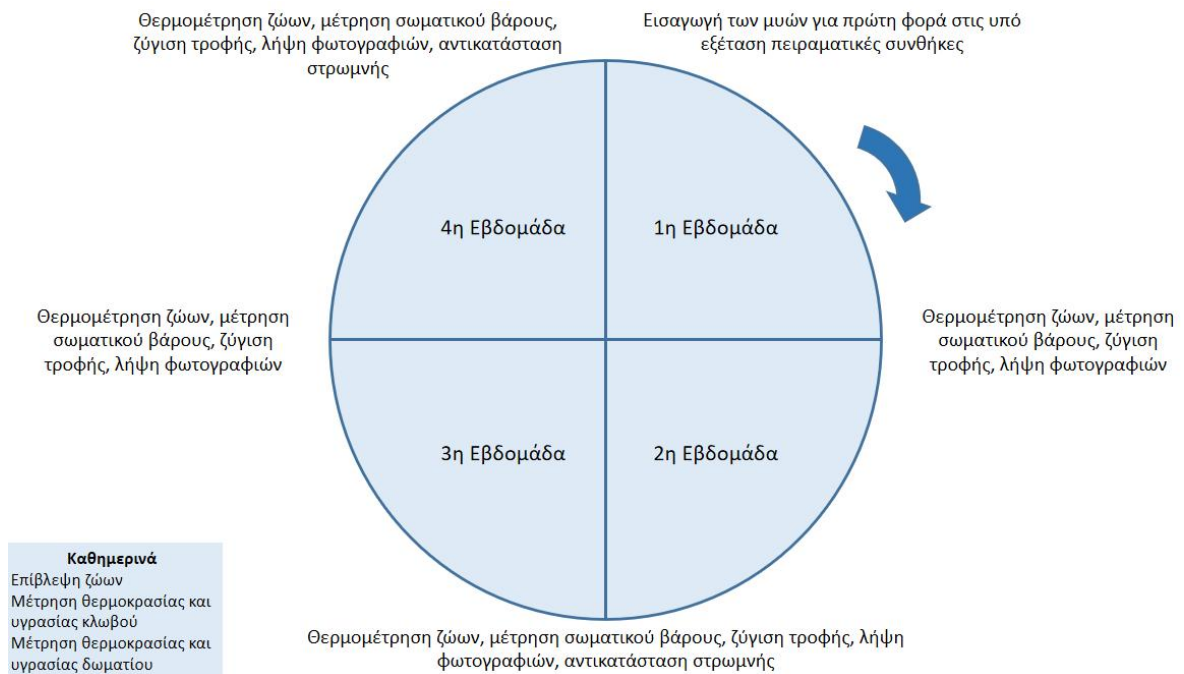


Σχεδιάγραμμα 1: Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των ζώων στις ομάδες πειραματισμού. Τα κριτήρια ταξινόμησης είναι η ποσότητα στρωμνής (χαμηλή / υψηλή), το φύλο (αρσενικό / θηλυκό) και η φυλή (de-/de- / 129SV). Προκύπτουν 8 ομάδες πειραματισμού, για κάθε μια από τις οποίες δημιουργήθηκε με διαδικασία κωδικοποίησης ένα όνομα (μπλε γράμματα).

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν σφάλματα (statistical bias) και να εξασφαλιστεί αξιοπιστία αποτελεσμάτων, λήφθηκαν ενέργειες που αφορούν τον πειραματικό σχεδιασμό. Με τεχνική της τυχαιοποίησης (randomisation), υλοποιήθηκε τυχαίος

διαμοιρασμός των μυών στις δύο συνθήκες στέγασης, πάντα όμως με βάση το φύλο και το στέλεχος. Ακολούθησε η σήμανση των ζώων, που έγινε με τρύπημα στο αυτί, καθώς κρίθηκε πως η προσωρινή σήμανση με χρωματισμό της ουράς δεν θα εξυπηρετούσε. Η λήψη μετρήσεων γινόταν κάθε φορά με τυχαία σειρά κλουβιών και ζώων. Όλα τα κλουβιά βρισκόνταν στο ίδιο δωμάτιο, όμως η θέση τους άλλαζε ανά εβδομάδα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν επιδράσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι σε κλουβιά που βρισκόνταν πιο κοντά στην πόρτα εξόδου του δωματίου, λόγω της ροής αέρα, η θερμοκρασία ήταν μικρότερη σε σχέση με τα κλουβιά που ήταν πιο απομακρυσμένα από την πόρτα, με μια διαφορά της τάξεως 1°C (ανιχνεύσιμη από τους αισθητήρες των κλωβών).

Τα ζώα επιβλέπονταν σε καθημερινή βάση, καθώς ήταν σημαντικό να ελέγχεται η κατάστασή τους, η κατάσταση της στρωμνής, η θερμοκρασία και η υγρασία μέσα στο κλουβί. Οι μετρήσεις θερμοκρασίας και υγρασίας στο δωμάτιο και στους κλωβούς, πραγματοποιούνταν τις πρωινές ώρες, όταν άνοιγε η πόρτα του δωματίου για πρώτη φορά την ημέρα, καθώς τότε η θερμοκρασία ήταν πιο σταθερή (δεν υπήρχαν ρεύματα αέρα από τη διέλευση ανθρώπων, η πόρτα ήταν κλειστή κατά τη διάρκεια της νύχτας). Μετά το τέλος της πρώτης και της τρίτης εβδομάδας, γίνονταν με τη σειρά οι εξής διαδικασίες: (1) θερμομετρώνταν κάθε ζώο διαδοχικά, (2) κάθε ζώο ζυγίζονταν, (3) ζυγίζονταν η τροφή που είχε απομείνει, (4) λαμβάνονταν φωτογραφίες από την ανώτερη επιφάνεια της στρωμνής μέσα στο κλουβί, (5) επαναφορά των ζώων στο ίδιο κλουβί. Στο τέλος της δεύτερης και της τέταρτης εβδομάδας επιτελούνταν οι παραπάνω διαδικασίες, με τη διαφορά ότι πραγματοποιούνταν επιπλέον αλλαγή της στρωμνής, με την τοποθέτηση των ζώων σε καθαρά κλουβιά με την αντίστοιχη ποσότητα στρωμνής (Σχεδιάγραμμα 2).



Σχεδιάγραμμα 2: Σχηματική απεικόνιση της ακολουθίας διαδικασιών στο πλαίσιο του πειραματισμού. Για κάθε υπό εξέταση ομάδα επιτελούνταν η παραπάνω αλληλουχία διαδικασιών.

2.4 Μέτρηση θερμοκρασίας και υγρασίας δωματίου και κλωβού

Χρησιμοποιήθηκαν ψηφιακά θερμόμετρα/υγρόμετρα της εταιρίας LIFE FLEXY, με εύρος μέγιστης θερμοκρασίας -10°C έως +50°C και υγρασίας 20% έως 99%, καθώς και ακρίβεια +/- 1,5°C. Εγκαταστάθηκαν τόσο στο δωμάτιο στέγασης, όσο και στο εσωτερικό των κλωβών (Ενότητα 2.3).

2.5 Μέτρηση θερμοκρασίας σώματος

Χρησιμοποιήθηκε θερμόμετρο υπέρυθρης ακτινοβολίας της εταιρίας MICROLIFE (μοντέλο NC 100). Η υπέρυθρη θερμομέτρηση έχει χρησιμοποιηθεί ξανά. Κρίθηκε ότι είναι καλύτερη μέθοδος θερμομέτρησης σε σχέση με τη θερμομέτρηση από τον πρωκτό (rectal temperature measurement), διότι δεν δημιουργεί το ίδιο αίσθημα άγχους. Παρά το γεγονός ότι μετράται η θερμοκρασία δέρματος, η οποία έχει κάποια απόκλιση σε σχέση με την κεντρική θερμοκρασία σώματος, η χρήση εξωτερικών θερμομέτρων είναι μια αποδεκτή μέθοδος εκτίμησης της θερμοκρασίας στους μύες⁶⁰.

2.6 Μέτρηση σωματικού βάρους και κατανάλωσης τροφής

Τα ζώα τοποθετούνταν σε χάρτινο περιέκτη (του οποίου το βάρος αφαιρούνταν) και ζυγίζονταν με ζυγό της εταιρίας DELMAC. Οι τιμές βάρους καταγράφονταν για τα όλα τα ζώα σε κάθε κλωβό και στη συνέχεια υπολογίζονταν ο μέσος όρος βάρους για κάθε κλουβί. Αυτό βοήθησε στην μετέπειτα ανάλυση.

Για τον υπολογισμό της κατανάλωσης τροφής, μια φορά την εβδομάδα σε σταθερή μέρα, ζυγίζονταν η εναπομένουσα τροφή της ταϊστρας. Η τιμή του βάρους της τροφής που προέκυπτε αφαιρούνταν από την τιμή βάρους τροφής που είχε προστεθεί την προηγούμενη εβδομάδα. Μετά από τη ζύγιση, συμπληρώνονταν τροφή, μέχρι σε μια σταθερή τιμή βάρους που είχε οριστεί. Με τον τρόπο αυτό δεν υπολογίζεται ακριβώς η κατανάλωση τροφής, μιας και οι μύες χρησιμοποιούν κάποια pellet χωρίς να τα καταναλώνουν, αλλά προσδιορίζεται η ποσότητα εξαφάνισης της τροφής, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης και στο παρελθόν⁶¹.

2.7 Επιτήρηση ζώων και αξιολόγηση της συμπεριφοράς εντός κλωβού

Χρησιμοποιήθηκε ηθόγραμμα² (Πίνακας 1), που χρησιμοποίησαν οι (Freyman, 2015)⁵⁰, Van Oortmerssen (1971)⁶² και Jirkof (2013)⁶³. Η επιτήρηση πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση στις 13:00 και συμμετείχαν δύο άτομα. Περιελάμβανε την παρατήρηση των ζώων σε κλειστό κλουβί και ύστερα σε ανοιχτό. Κάθε συμπεριφορά βαθμολογούνταν ως προς τη συχνότητα εμφάνισης σε κλίμακα 1-3.

Πίνακας 1: Ηθόγραμμα - Πρότυπο παρατήρησης συμπεριφοράς των μυών μέσα στους κλωβούς.

² Ηθόγραμμα: Πίνακας ή περιγραφή των μοντέλων συμπεριφοράς ενός συγκεκριμένου είδους, συνήθως όσον αφορά την ατομική συμπεριφορά ή τις αλληλεπιδράσεις των ζευγών. Ορισμός από <http://www.pescalex.org/glossaries/search/2/gr/?search=e&term=662>

Συμπεριφορά	Επεξήγηση
Ανταγωνιστική αλληλεπίδραση (Agonistic interaction)	Επιθετική συμπεριφορά έναντι σε συμβιώμενα ζώα (κυνήγι, δαγκώμα)
Κατανάλωση τροφής (Feeding)	Αλληλεπίδραση με την ταΐστρα, μάσηση ή κατανάλωση τροφής
Κατανάλωση νερού (Drinking)	Αλληλεπίδραση με το μπουκάλι, κατάποση νερού
Κινητικότητα (Locomotion)	Περπάτημα, τρέξιμο, σκαρφάλωμα
Σχηματισμός φωλιάς (Nest-building)	Αλληλεπίδραση με τη στρωμνή, μετακίνηση στρωμνής με σκοπό τη δημιουργία φωλιάς
Ξεκούραση (Resting)	Ακίνησια σε ανοιχτή ή κλειστή θέση με κλειστά ή ανοιχτά μάτια
Καθαρισμός, περιποίηση (Grooming)	Περιποίηση του τριχώματος με τη γλώσσα ή τα άκρα
Σκάψιμο - θάψιμο (Digging -burrowing)	Απομάκρυνση της στρωμνής με τα άκρα, προς τον πυθμένα του κλωβού

2.8 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε τα προγράμματα στατιστικής ανάλυσης *GraphPad Prism 9.5.0* και *Microsoft Excel* όπως και το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνων *ImageJ*. Με τη βοήθεια του πρώτου προγράμματος, επιχειρήθηκε να γίνουν τα απαραίτητα τεστ ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος με τη θερμοκρασία του κλωβού για κάθε μέρα που έγιναν μετρήσεις, κάτι που επαναλήφθηκε ομοίως και για την υγρασία. Ύστερα, με διεξαγωγή t-test (unpaired), όπου ο συντελεστής σημαντικότητας ορίστηκε ως 0,05, καταφέραμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα αναφορικά με την ύπαρξη ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας κλωβών ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες στέγασης. Με το πρόγραμμα *Microsoft Excel* σχεδιάστηκαν με ακρίβεια τα διαγράμματα διακύμανσης του σωματικού βάρους. Όσο αφορά την ανάλυση των εικόνων, με τη βοήθεια του προγράμματος *ImageJ*, έγινε μια εκτίμηση της επιφάνειας που καταλαμβάνουν τα κόπρανα των μυών ως προς τη συνολική επιφάνεια που καλύπτει η ανώτατη στρώση της στρωμνής (δηλαδή εκείνης που εφάπτεται με τους μύες). Αυτό υλοποιήθηκε με σκοπό την ανάδειξη τυχόν διαφοράς στη καθαρότητα της στρωμνής όταν η ποσότητα της στο κλουβί είναι ενισχυμένη σε σχέση με τις συμβατικές συνθήκες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη θερμοκρασία κλωβού

Εκτιμήθηκε ο βαθμός της συσχέτισης της θερμοκρασίας και υγρασίας δωματίου με την θερμοκρασία και υγρασία κάθε μεμονωμένου κλωβού (Πίνακας 2). Σκοπός είναι η εύρεση τυχόν διαφοράς στη συσχέτιση με το περιβάλλον ανάμεσα σε ομάδες χαμηλής και υψηλής ποσότητας στρωμνής. Συγκεκριμένα εάν η συσχέτιση είναι μικρότερη σε ομάδες ενισχυμένης στρωμνής ως προς τις ομάδες μειωμένης στρωμνής, αποτελεί ένδειξη ότι η αυξημένη στρωμνή στους κλωβούς καθιστά το περιβάλλον εντός κλωβού περισσότερο ανεπηρέαστο από τις συνθήκες δωματίου στέγασης. Παράλληλα με την υλοποίηση ανεξάρτητων t-test στις τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας κλωβών σε ομάδες χαμηλής και υψηλής στρωμνής, επιτυγχάνεται η παρατήρηση τυχόν στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Το συμπέρασμα για την επίδραση που μπορεί να έχει η αυξημένη ποσότητα στρωμνής στις τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας, θα προκύψει όταν και τα δύο κριτήρια συμφωνούν. Δηλαδή, το αποτέλεσμα από τα t-test πρέπει να επαληθεύει το αποτέλεσμα από τη δοκιμασία συσχέτισης.

de-/de- θηλυκά (DnFL vs DnFH)

Και στις δύο φάσεις του πειράματος, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,7795$) στη θερμοκρασία κλωβού μεταξύ ομάδων θηλυκών διαγονιδιακών με χαμηλή και υψηλή ποσότητα στρωμνής. Επιπλέον ανάμεσα σε ομάδες διαφορετικού όγκου στρωμνής, δεν παρατηρήθηκε διαφορετικός βαθμός συσχέτισης της θερμοκρασίας περιβάλλοντος με τη θερμοκρασία κλωβού ($r_{DnFL} = 0,4543$ και $r_{DnFH} = 0,4346$).

de-/de- αρσενικά (DnML vs DnMH)

Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη θερμοκρασία κλωβού μεταξύ ομάδων αρσενικών διαγονιδιακών ζώων με χαμηλή και υψηλή ποσότητα στρωμνής σε καμιά από τις δύο φάσεις ($p = 0,1908$). Παράλληλα, η συσχέτιση με την θερμοκρασία δωματίου έμεινε στα ίδια επίπεδα ανεξαρτήτως ποσότητας στρωμνής ($r_{DnML} = 0,5885$ και $r_{DnMH} = 0,6124$).

129SV θηλυκά (SVFL vs SVFH)

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη θερμοκρασία κλωβού μεταξύ ομάδων χαμηλής και υψηλής ποσότητας στρωμνής ($p = 0,1451$), όπως ούτε και υπήρξε διαφορά στη συσχέτιση με τη θερμοκρασία δωματίου ($r_{SVML} = 0,8254$ και $r_{SVMH} = 0,7714$).

129SV αρσενικά (SVML vs SVMH)

Η διαφορά στη θερμοκρασία κλωβού ανάμεσα στην ομάδα χαμηλού και υψηλού όγκου στρωμνής δεν ήταν σημαντική ($p = 0,0932$), όπως ούτε και η διαφορά στη συσχέτιση με τη θερμοκρασία δωματίου ($r_{SVML} = 0,8133$ και $r_{SVMH} = 0,7848$).

3.2 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στην υγρασία κλωβού

de-/de- θηλυκά (DnFL vs DnFH)

Η διαφορά στην υγρασία κλωβού μεταξύ των ομάδων μειωμένης και αυξημένης στρωμνής ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,0486$). Ταυτόχρονα, οι ομάδες με μειωμένη

στρωμνή έδειξαν μεγαλύτερη συσχέτιση της υγρασίας κλωβού με την υγρασία δωματίου σε σχέση με τις ομάδες αυξημένης στρωμνής και στις δύο φάσεις ($r_{DnFL} = 0,5539$ και $r_{DnFH} = 0,2090$).

de-/de- αρσενικά (DnML vs DnMH)

Οι τιμές υγρασίας κλωβού διέφεραν σημαντικά ανάμεσα σε συνθήκες λίγης και ενισχυμένης στρωμνής ($p = 0,0301$), όπως επίσης διέφερε και η συσχέτιση με την υγρασία περιβάλλοντος ($r_{DnML} = 0,9203$ και $r_{DnMH} = 0,6052$).

129SV θηλυκά (SVFL vs SVFH)

Δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην υγρασία κλωβού όταν διαφοροποιήθηκε η ποσότητα στρωμνής ($p = 0,4401$). Η συσχέτιση με την υγρασία δωματίου κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα για τις δύο συνθήκες στρωμνής ($r_{SVFL} = 0,6886$ και $r_{SVFH} = 0,6109$).

129SV αρσενικά (SVML vs SVMH)

Μεταξύ των ομάδων χαμηλής και υψηλής στρωμνής η διαφορά στις τιμές της υγρασίας κλωβού ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,0145$ αντίστοιχα). Αυτό αντανακλάται και στα αποτελέσματα από τη δοκιμή συσχέτισης με την υγρασία δωματίου, όπου φαίνεται ότι σε συνθήκες υψηλής ποσότητας στρωμνής η συσχέτιση είναι εμφανώς μειωμένη, σε αντίθεση με τις συνθήκες χαμηλής στρωμνής ($r_{SVML} = 0,9194$ και $r_{SVMH} = 0,6341$).

Πίνακας 2: Πίνακας αποτελεσμάτων των δοκιμασιών συσχέτισης ανάμεσα στη θερμοκρασία/υγρασία στο εσωτερικό του κλωβού και στη θερμοκρασία/υγρασία του δωματίου στέγασης. (r = συντελεστής Pearson, p = συντελεστής στατιστικής σημαντικότητας)

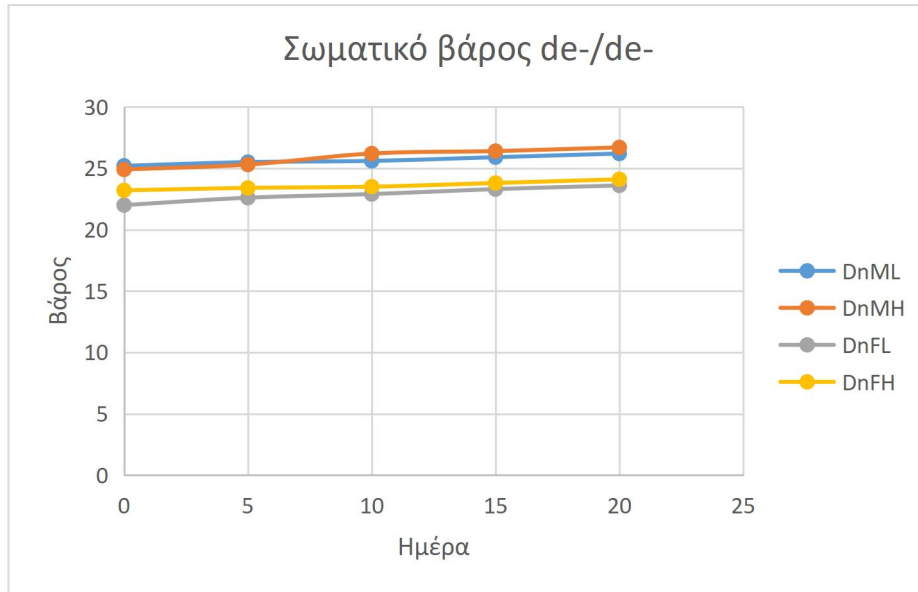
Ομάδα πειραματισμού	Δοκιμασία συσχέτισης θερμοκρασίας δωματίου με θερμοκρασία κλωβού		Δοκιμασία συσχέτισης υγρασίας δωματίου με υγρασία κλωβού	
DnFL	$r = 0,4543$	$p = 0,044$	$r = 0,5539$	$p = 0,011$
DnFH	$r = 0,4346$	$p = 0,055$	$r = 0,2090$	$p = 0,039$
DnML	$r = 0,5885$	$p = 0,006$	$r = 0,9203$	$p < 0,0001$
DnMH	$r = 0,6124$	$p < 0,0001$	$r = 0,6052$	$p = 0,0047$
SVFL	$r = 0,8254$	$p < 0,0001$	$r = 0,6886$	$p = 0,0008$
SVFH	$r = 0,7714$	$p < 0,0001$	$r = 0,6109$	$p = 0,0042$
SVML	$r = 0,8133$	$p < 0,0001$	$r = 0,9194$	$p < 0,0001$
SVMH	$r = 0,7848$	$p < 0,0001$	$r = 0,6341$	$p < 0,0001$

3.3 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη θερμοκρασία σώματος

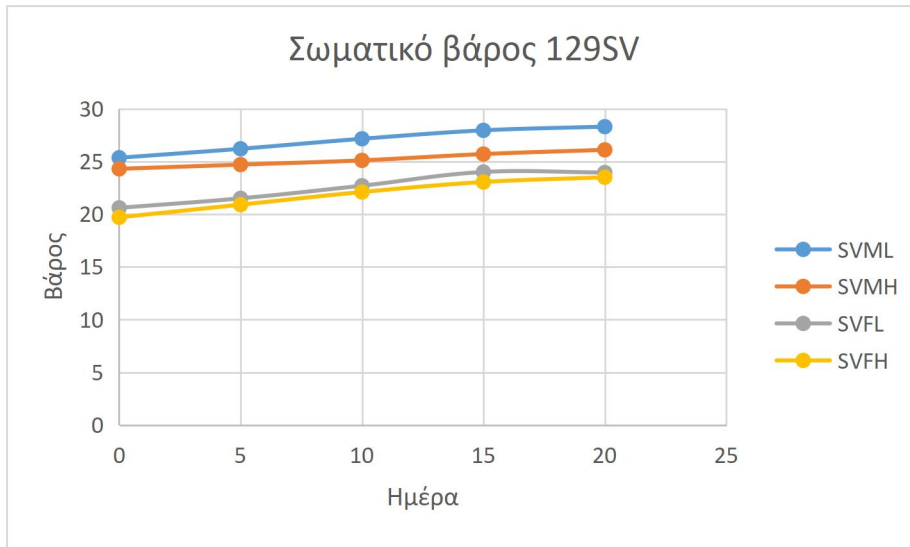
Δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές θερμοκρασιών σώματος των μυών, ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες στεγάζονταν. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 64 μετρήσεις θερμοκρασίας σώματος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε συνθήκες χαμηλής ποσότητας στρωμνής η θερμοκρασία σώματος είχε μέση τιμή $35,89^{\circ}\text{C} \pm 0,28$, ενώ σε υψηλή ποσότητα στρωμνής η μέση τιμή ήταν $35,93 \pm 0,33$. Εφόσον, όπως αναφέρθηκε, στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά στη θερμοκρασία πάνω από $0,5^{\circ}\text{C}$, προκύπτει ότι η θερμοκρασία σώματος δεν μεταβλήθηκε.

3.4 Επίδραση της ποσότητας στρωμνης στο σωματικό βάρος

Προκειμένου να εξεταστεί με ευκολία, εάν ο όγκος στρωμνης διαδραμάτισε κάποιον ρόλο στην διακύμανση του σωματικού βάρους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τοποθετήθηκαν οι τιμές των μετρήσεων σε διαγράμματα ανά φυλή μυών (Εικόνες 14 και 15).



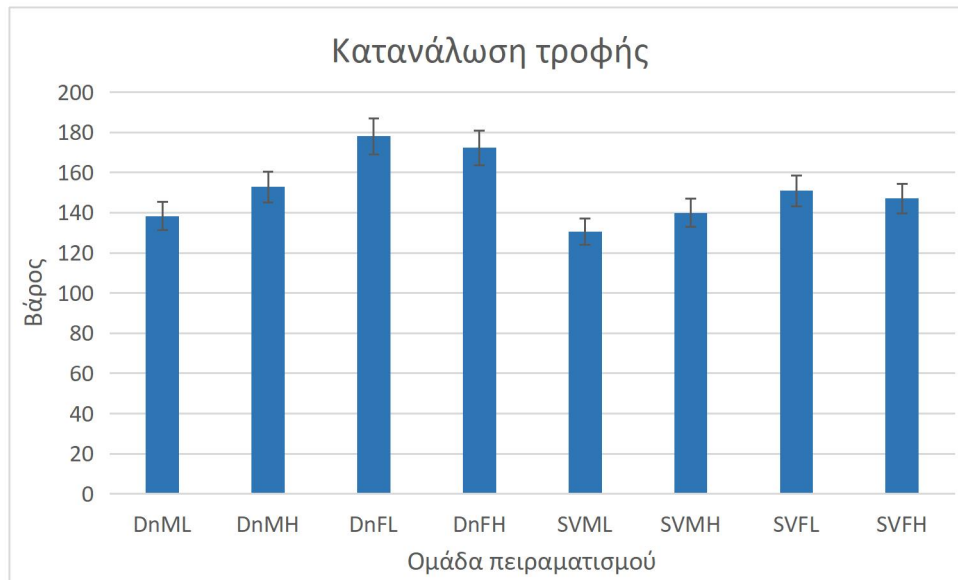
Εικόνα 14: Διάγραμμα διακύμανσης σωματικού βάρους στις ομάδες de-/de- κατά την πρώτη φάση του πειράματος.



Εικόνα 15: Διάγραμμα διακύμανσης σωματικού βάρους στις ομάδες 129SV κατά τη δεύτερη φάση του πειράματος.

3.4 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στην κατανάλωση τροφής

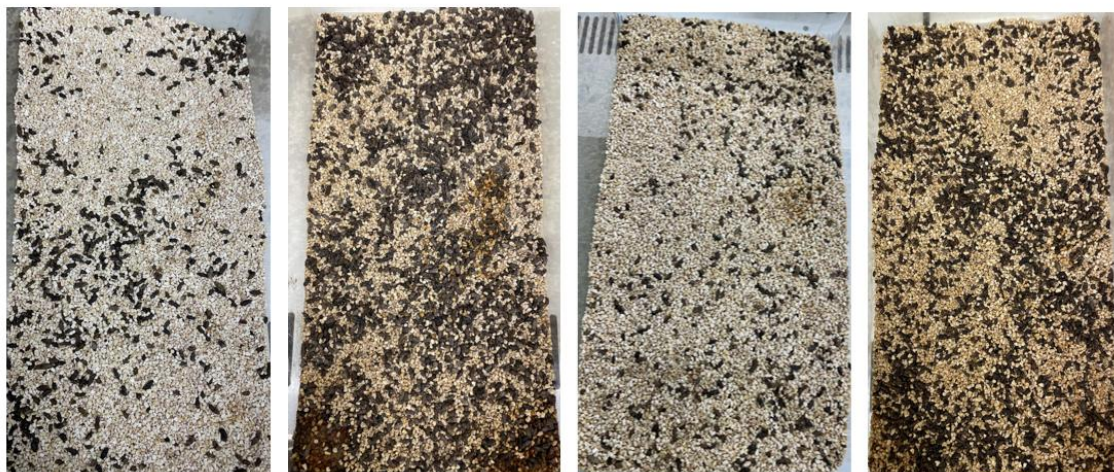
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανάλωση τροφής μεταξύ των ομάδων πειραματισμού. Από το διάγραμμα (Εικόνα 14), σημειώνεται ότι τα θηλυκά καταναλώνουν περισσότερη τροφή σε σχέση με τα αρσενικά της ίδιας φυλής. Οι μύες της φυλής 129SV καταναλώνουν λιγότερη τροφή σε σχέση με τους μύες de-/de-. Μύες που στεγάζονται σε κλωβούς αυξημένου όγκου στρωμνής, παρατηρείται ότι καταναλώνουν περισσότερη τροφή σε σχέση με τους αντίστοιχους που στεγάζονται σε κλωβούς χαμηλής ποσότητας στρωμνής. Ωστόσο αυτές οι διαφορές δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές (μέση τιμή $151,26 \pm 16,48$).



Εικόνα 16: Διάγραμμα που δείχνει την κατανάλωση τροφής (σε γραμμάρια) κάθε ομάδας πειραματισμού καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

3.5 Επίπεδο καθαρότητας στρωμνής

Με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης εικόνων *ImageJ*, επιλέχθηκαν οι περιοχές της ανώτερης επιφάνειας της στρωμνής που καλύπτονταν από κόπρανα των μυών και επιχειρήθηκε κάποιου είδους ποσοτικοποίησής τους. Μετά από ανάλυση των φωτογραφιών που απεικόνιζαν την συνολική εξωτερική επιφάνεια της στρωμνής (Εικόνα 17), απεδείχθη ότι η διαφορά στην έκταση που καταλαμβάνουν τα κόπρανα διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις δύο υπό εξέταση συνθήκες στέγασης. Παρακάτω ακολουθεί πίνακας με τις τιμές που προέκυψαν από ανάλυση ληφθέντων φωτογραφιών και ο οποίος επιδεικνύει τη διαφορά αυτή (Πίνακας 3). Δεν προέκυψε σημαντική διαφορά στην καθαρότητα στρωμνής ανάμεσα σε διαφορετικά γένη και φύλα μυών.



Εικόνα 17: Παραδείγματα φωτογραφιών που απεικονίζουν το επίπεδο καθαρότητας της στρωμνής μέσα στο κλωβί. Η πρώτη και η τρίτη εικόνα αντιστοιχούν σε ομάδα με συνθήκες ενισχυμένης στρωμνής, ενώ η δεύτερη και η τέταρτη σε συνθήκες χαμηλής ποσότητας στρωμνής. Όλες οι φωτογραφίες λήφθηκαν δύο εβδομάδες μετά την τοποθέτηση των μυών σε καθαρούς κλωβούς.

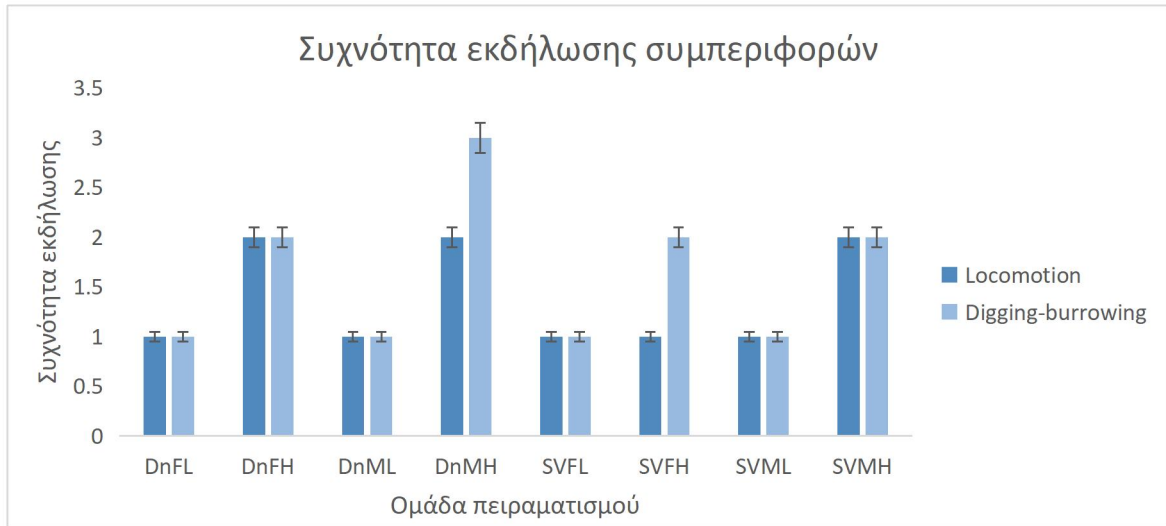
Πίνακας 3: Ενδεικτικές τιμές της κάλυψης της στρωμνής με κόπρανα, μετά από ανάλυση εικόνων στο πρόγραμμα *ImageJ*. Παρατηρείται σημαντική διαφορά στην επιφάνεια που καλύπτουν τα κόπρανα όταν η ποσότητα στρωμνής είναι χαμηλή (περίπου 3 φορές μεγαλύτερη) σε σχέση με την αντίστοιχη επιφάνεια σε κλωβιά με υψηλή ποσότητα στρωμνής.

Ομάδα πειραματισμού	Επιφάνεια κοπράνων
SVFL	3.639.781
SVFH	1.590.099
SVML	3.298.425
SVMH	1.632.769
DnFL	3.412.280
DnFH	1.594.864
DnML	3.021.638
DnMH	1.972.565

3.6 Επίδραση της ποσότητας στρωμνής στη συμπεριφορά

Παρατηρήθηκε ένα μοντέλο συμπεριφοράς, με τους μύες να παραμένουν σχετικά αδρανείς στα πρώτα λεπτά της παρατήρησης και προοδευτικά να αυξάνεται η κινητικότητα τους μέσα στο κλωβί. Μετά το άνοιγμα του κλωβού, ως επί το πλείστον οι μύες παρουσίαζαν αυξημένη κινητικότητα. Ενίοτε παρατηρούνταν επιθετικότητα μεταξύ αρσενικών μυών, ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης αυτής της συμπεριφοράς ήταν μικρή. Δεν σημειώθηκαν εκδορές ή σημάδια τραυματισμού στους μύες κατά τη διάρκεια των παρατηρήσεων. Σχεδόν πάντα παρατηρούνταν εξερεύνηση στην επιφάνεια της σχάρας. Η συμπεριφορά που εμφάνισε μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στις δύο συνθήκες στέγασης ήταν η δραστηριότητα σκαψίματος (Εικόνα 18). Και στα δύο φύλα και γένη, μύες που διαβίωναν σε κλωβούς με υψηλή ποσότητα στρωμνής, λίγα λεπτά μετά το άνοιγμα του κλωβού είχαν την τάση να σκάβουν στην στρωμνή, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε μύες που βίωναν σε συνθήκες χαμηλής ποσότητας στρωμνής. Ωστόσο, η συχνότητα αυτής της συμπεριφοράς ήταν μειωμένη όσο οι ομάδες αυξημένης

στρωμνής πλησίαζαν στο τέλος του πειραματισμού, δηλαδή παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα σκαψίματος την τέταρτη εβδομάδα σε σχέση με την πρώτη ή δεύτερη εβδομάδα πειραματισμού.



Εικόνα 18: Διάγραμμα συχνότητας εμφάνισης δύο συμπεριφορών, της κινητικότητας και του σκαψίματος σε κάθε ομάδα πειραματισμού.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μελέτη της επίδρασης που έχει η στέγαση σε κλωβούς με αυξημένη ποσότητα στρωμνής τόσο στο μικροπεριβάλλον του κλωβού όσο και σε επίπεδο ζώων. Ο αντίκτυπος της στέγασης σε συνθήκες αυξημένης ποσότητας στρωμνής στον οργανισμό των μυών έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών στο παρελθόν, ωστόσο μέχρι τώρα δεν γίνεται ιδιαίτερη αναφορά σχετικά με τις παραμέτρους που επικρατούν στο εσωτερικό του κλωβού. Κατανοώντας τα οφέλη που παρέχει αυτή η μέθοδος εμπλουτισμού περιβάλλοντος, θα μπορούν να συμπληρωθούν οι γνώσεις σχετικά με τη στέγαση των εργαστηριακών μυών, η οποία είναι κρίσιμη παράμετρος στην μεταφραστική έρευνα. Επιπλέον, στην παραπάνω εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικά πρότυπα, μύες από δύο φυλές, για τις οποίες οι καταγραφές στη βιβλιογραφία, είναι λίγες.

Έχει προταθεί πως μύες που διαβιούν σε συνθήκες αυξημένου όγκου στρωμνής, εμφανίζουν ένα πιο υγιές προφίλ. Συγκεκριμένα εμφανίζουν, σε σχέση με μύες που στεγάζονται σε κλωβούς με χαμηλή ποσότητα στρωμνής, αυξημένη θερμοκρασία σώματος, μείωση στη μάζα οργάνων όπως η καρδιά, το ήπαρ και οι νεφροί, αύξηση του μήκους ουράς αλλά και μειωμένη κατανάλωση τροφής, ευρήματα που αντικατοπτρίζουν τη μειωμένη θερμορυθμιστική δραστηριότητα. Οι μύες που βρίσκονται σε χρόνιο θερμικό στρες και κατά συνέπεια υπό αυξημένη λειτουργία θερμορύθμισης, τείνουν να προσλαμβάνουν περισσότερη τροφή, προκειμένου να καλύψουν τις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες τους, εμφανίζουν αύξηση του μεγέθους οργάνων που συμμετέχουν στη θερμορύθμιση, καθώς και λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών στις οποίες ζουν, έχουν μικρότερη ουρά, εξ αιτίας της μειωμένης αιματικής ροής. Υπό τις συνθήκες στέγασης αυξημένου όγκου στρωμνής, φαίνεται πως δεν υπάρχει μεγάλη απαίτηση για θερμορύθμιση⁵⁵.

Στη παρούσα μελέτη, η αύξηση της ποσότητας στρωμνής μέσα στον κλωβό δεν έδειξε να μεταβάλλει στατιστικά σημαντικά τη θερμοκρασία του. Αναφορικά με τη θερμοκρασία δωματίου, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην συσχέτισή της με αυτής των κλωβών, ανεξαρτήτου ποσότητας στρωμνής. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η αδυναμία επαρκούς θερμομόνωσης του περιβάλλοντος του κλωβού από τις συγκεκριμένες ποσότητες στρωμνής. Αναγνωρίζοντας ότι ο όγκος του δωματίου είναι υπερπολλαπλάσιος αυτού του κλωβού και με δεδομένη την ανυπαρξία θερμομόνωσης στην πειραματική μας διάταξη, εύλογα παρατηρείται υψηλή συσχέτιση της θερμοκρασίας δωματίου με αυτής των πειραματικών κλωβών. Ακολουθώντας τις διεθνείς οδηγίες, ο αριθμός των ζώων ήταν τέτοιος που δεν μπορούσε από μόνος του να παράξει θερμικά φορτία ικανά να διαφοροποιήσουν τη θερμοκρασία του μη μονωμένου μικροπεριβάλλοντος σε σχέση με το περιβάλλον του δωματίου. Ακολούθως, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στη θερμοκρασία σώματος των μυών που στεγάζονταν σε διαφορετικές συνθήκες, κάτι που δεν συμφωνεί με προαναφερθείσα βιβλιογραφία, όμως ενδέχεται οι ποσότητες στρωμνής που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα περίπτωση να μην έχουν μεγάλη επίδραση στην θερμοκρασία σώματος.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι, η συσχέτιση της υγρασίας κλωβών με τη μετρούμενη υγρασία στο περιβάλλον του δωματίου διαφέρει όταν διαφοροποιείται η ποσότητα στρωμνής. Όταν στο εσωτερικό των κλωβών υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα

στρωμνής, η συσχέτιση της υγρασίας κλωβού και υγρασίας δωματίου είναι στατιστικά σημαντικά λιγότερη. Η στρωμνή που βρίσκεται σε περίσσεια, διαθέτει τη δυνατότητα μεγαλύτερης κατακράτησης υγρασίας, πηγή της οποίας είναι τα ζώα, τα κόπρανά τους, το παρεχόμενο νερό. Αυτές οι πηγές είναι αναπόφευκτες, όμως υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία σχετικά με τις επιπτώσεις της αυξημένης υγρασίας στον κλωβό (Ενότητα 1.1.2). Η μειωμένη υγρασία στο εσωτερικό των κλωβών είναι ζητούμενο για την καλή υγεία των οργανισμών.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι σε μελέτη απεδείχθη ότι μύες που είχαν υποβληθεί σε ένα είδος στέγασης με τρία διαμερίσματα, μεταξύ τους συγκοινωνούντα, εμφάνισαν την τάση να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες σε κάθε διαμέρισμα. Δηλαδή, απέφευγαν να δημιουργήσουν φωλιές ή να επιτελέσουν λοιπές δραστηριότητες στο διαμέρισμα που συνήθιζαν να εκκρίνουν τα απόβλητά τους. Ακόμα, παρατηρήθηκε πως μετέφεραν στρωμνή προς το διαμέρισμα με τα απόβλητα, ενδεχομένως για να ελαττώσουν τα επίπεδα αμμωνίας σε εκείνο το χώρο⁶⁴. Οι μύες αρέσκονται στη διαμερισματοποίηση του χώρου τους και δεν προτιμούν ιδιαίτερα τη άμεση επαφή με τα απόβλητά τους. Σε πραγματικές συνθήκες, η τμηματοποίηση του χώρου στέγασης είναι ανέφικτη, λόγω του μεγάλου πλήθους ζώων και κλωβών στις μονάδες. Για τον λόγο αυτό, η αύξηση της ποσότητας της προστιθέμενης στους συμβατικούς κλωβούς στρωμνής, δύναται να βοηθήσει σε αυτό το ζήτημα. Στη παρούσα μελέτη σημειώθηκε ότι σε συνθήκες αυξημένου όγκου στρωμνής ήταν μειωμένη η έκταση που καταλαμβάνουν τα απόβλητα των μυών ως προς την εξωτερική επιφάνεια της στρωμνής. Καθώς αυτή είναι η επιφάνεια που εφάπτεται με τα ζώα, συμπεραίνουμε ότι με τον τρόπο αυτό διαβιούν σε μια πιο καθαρή επιφάνεια. Επιπλέον καθίσταται εφικτή η παράταση του χρονικού διαστήματος μέχρι την αντικατάσταση της στρωμνής, έτσι αποφεύγεται η συχνή “ενόχληση” των ζώων, που αναπόφευκτα απορρέει από διαδικασία μεταφοράς σε νέο κλουβί. Παράλληλα παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά στις οσμές, οι οποίες κατά το άνοιγμα των κλωβών με αυξημένο όγκο στρωμνής ήταν σημαντικά πιο ήπιες σε σχέση με των κλωβών μειωμένης στρωμνής. Τα παραπάνω εξασφαλίζουν λιγότερη συχνότητα έκθεσης του προσωπικού σε δυσάρεστες οσμές και αλλεργιογόνα, γεγονός μείζονος σημασίας όσο αφορά το ανθρώπινο δυναμικό που εργάζεται μακροχρόνια σε μονάδες διαχείρισης ζώων εργαστηρίου.

Η ερευνητική ομάδα υποθέτει ότι η μεγαλύτερη ποσότητα στρωμνής, παρέχει τη δυνατότητα στα τρωκτικά να βελτιώνουν την επιφάνεια διαβίωσης, εκμεταλλευόμενα το βάθος που τους παρέχεται. Πράγματι, μύες που στεγάζονταν σε συνθήκες ενισχυμένου όγκου στρωμνής, εκδήλωσαν σε μεγαλύτερη συχνότητα τη συμπεριφορά σκαψίματος, αλλά και αυξημένη κινητικότητα. Συνδυαστικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα που αφορούν τα επίπεδα καθαρότητας στρωμνής, φαίνεται πως οι μύες είχαν την τάση να κρύβουν τα κόπρανά τους μέσα στη στρωμνή, τα οποία αντί να είναι συγκεντρωμένα στην εξωτερική επιφάνεια, ήταν διάχυτα σε όλο το βάθος της. Καθώς η κατανάλωση της τροφής ήταν ίδια σε ομάδες χαμηλής και υψηλής στρωμνής, δεν μπορούμε να πούμε ότι παράγονταν λιγότερα κόπρανα στις εμπλουτισμένες συνθήκες.

Όπως προαναφέρθηκε, το σκάψιμο ήταν μια συμπεριφορά που εκδηλώνονταν σε μεγαλύτερη συχνότητα σε κλωβούς με περισσότερη στρωμνή. Το σκάψιμο είναι έμφυτη δραστηριότητα, με σκοπό την προστασία από επικίνδυνα εξωτερικά ερεθίσματα, την εύρεση τροφής και τη δημιουργία καταφυγίων. Επομένως, όπως επιβεβαιώνεται και στη

βιβλιογραφία, η αλληλεπίδραση με τη περίσσεια στρωμνής, παρέχει το πλεονέκτημα εκδήλωσης φυσικών συμπεριφορών στους μύες. Στην μεταφραστική έρευνα που χρησιμοποιεί ως πρότυπα τους μύες, η αξιολόγηση της συμπεριφοράς σκαψίματος είθισται να χρησιμοποιείται σε μελέτες νευρολογικών και ψυχιατρικών ασθενειών, καθώς έχει συνδεθεί με αντιδράσεις άγχους. Πρακτικά, παρατηρήθηκε ότι κατά το άνοιγμα του κλωβού, μύες που στεγάζονταν σε συνθήκες αυξημένου όγκου στρωμνής, άρχιζαν να σκάβουν. Ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί το κίνητρο αυτής της συμπεριφοράς, ωστόσο εάν αναλογιστεί κανείς ότι ενδέχεται να είναι αγχολυτικό για τους μύες, η αξιοποίηση της ενισχυμένης ποσότητας στρωμνής λαμβάνει επιπλέον βαρύτητα⁶⁵.

Γενικότερα, φαίνεται πως οι μύες αρέσκονται στην διαβίωση σε κλωβούς με περισσότερη στρωμνή. Αυτό άλλωστε έδειξε και δοκιμασία προτίμησης (preference test), σε θηλυκούς μύες BALB/c και C57BL/6, που πέρασαν περισσότερο χρόνο σε κλωβούς με περίσσεια στρωμνής⁵⁴.

Έχοντας υπόψη όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα της χρήσης αυτής της μεθόδου εμπλουτισμού, τίθεται εύλογα το ερώτημα: Θα μπορούσε η αυξημένη ποσότητα στρωμνής στους κλωβούς να έχει πρακτική εφαρμογή στην εργαστηριακή ρουτίνα μιας μονάδας; Δεν πρόκειται για μια μέθοδο εμπλουτισμού περιβάλλοντος που στερείται μειονεκτημάτων. Κύριως αν αναλογιστεί κάποιος το κόστος που θα είχε μια τέτοια ενέργεια. Επίσης είναι αμφίβολο, κατά πόσο η παραπάνω στρωμνή στους κλωβούς θα είχε θετικό αντίκτυπο κατά τη διάρκεια διαδικασιών, όπως η αναπαραγωγή (breeding) ή η στέγαση νεογνών πριν τον απογαλακτισμό. Όπως προαναφέρθηκε η στρωμνή είναι ένα υλικό με το οποίο οι μύες έχουν εξοικειωθεί και εφόσον απεδείχθη ότι η στέγαση σε συνθήκες τετραπλάσιας ποσότητας παρέχει πολλαπλά οφέλη, ενδιαφέρον θα είχε η αξιολόγηση της εφαρμογής αυτής της μεθόδου εμπλουτισμού, από πλευράς πρακτικότητας, κόστους και ευκολίας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Hedrich, H. (Ed.). (2004). *The laboratory mouse*. Academic Press.
- ² Vandenberg, J. G. (2000). Use of house mice in biomedical research. *ILAR Journal*, 41(3), 133-135.
- ³ Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F., & Fisher, E. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics*, 24(1), 23-25.
- ⁴ Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine*, 110(3), 207.
- ⁵ Irvin, C. G., & Bates, J. H. (2003). Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respiratory research*, 4(1), 1-9.
- ⁶ Andersen, M. L., & Winter, L. M. (2017). Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- ⁷ Mogil, J. S. (2017). Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab animal*, 46(4), 136-141.
- ⁸ Gordon, C. J. (2012). Thermal physiology of laboratory mice: defining thermoneutrality. *Journal of thermal biology*, 37(8), 654-685.
- ⁹ Hankenson, F. C., Marx, J. O., Gordon, C. J., & David, J. M. (2018). Effects of rodent thermoregulation on animal models in the research environment. *Comparative medicine*, 68(6), 425-438.
- ¹⁰ Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., & Garner, J. P. (2013). Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiology & behavior*, 110, 87-95.
- ¹¹ Overton, J. M. (2010). Phenotyping small animals as models for the human metabolic syndrome: thermoneutrality matters. *International journal of obesity*, 34(2), S53-S58.
- ¹² Hankenson, F. C., Marx, J. O., Gordon, C. J., & David, J. M. (2018). Effects of rodent thermoregulation on animal models in the research environment. *Comparative medicine*, 68(6), 425-438.
- ¹³ Reitman, M. L. (2018). Of mice and men—environmental temperature, body temperature, and treatment of obesity. *FEBS letters*, 592(12), 2098-2107.
- ¹⁴ Jhaveri, K. A., Trammell, R. A., & Toth, L. A. (2007). Effect of environmental temperature on sleep, locomotor activity, core body temperature and immune responses of C57BL/6J mice. *Brain, behavior, and immunity*, 21(7), 975-987.
- ¹⁵ Gordon, C. J., Aydin, C., Repasky, E. A., Kokolus, K. M., Dheyongera, G., & Johnstone, A. F. (2014). Behaviorally mediated, warm adaptation: a physiological strategy when mice behaviorally thermoregulate. *Journal of thermal biology*, 44, 41-46.

- ¹⁶ Uchida, K., Shiuchi, T., Inada, H., Minokoshi, Y., & Tominaga, M. (2010). Metabolic adaptation of mice in a cool environment. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 459(5), 765-774.
- ¹⁷ Swoap, S. J., Li, C., Wess, J., Parsons, A. D., Williams, T. D., & Overton, J. M. (2008). Vagal tone dominates autonomic control of mouse heart rate at thermoneutrality. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(4), H1581-H1588.
- ¹⁸ Kokolus, K. M., Capitano, M. L., Lee, C. T., Eng, J. W. L., Waight, J. D., Hylander, B. L., ... & Repasky, E. A. (2013). Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20176-20181.
- ¹⁹ Eng, J. W. L., Reed, C. B., Kokolus, K. M., Pitoniak, R., Utley, A., Bucsek, M. J., ... & Hylander, B. L. (2015). Housing temperature-induced stress drives therapeutic resistance in murine tumour models through β 2-adrenergic receptor activation. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- ²⁰ Karp, C. L. (2012). Unstressing interperate models: how cold stress undermines mouse modeling. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1069-1074.
- ²¹ Shimba, A., Ejima, A., & Ikuta, K. (2021). Pleiotropic effects of glucocorticoids on the immune system in circadian rhythm and stress. *Frontiers in immunology*, 12, 706951.
- ²² Fischer, A. W., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2018). Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: an experimental study. *Molecular metabolism*, 7, 161-170.
- ²³ Kasza, I., Cuncannan, C., Michaud, J., Nelson, D., Yen, C. L. E., Jain, R., ... & Alexander, C. M. (2022). "Humanizing" mouse environments: Humidity, diurnal cycles and thermoneutrality. *Biochimie*.
- ²⁴ Silverman, J., Bays, D. W., & Baker, S. P. (2009). Ammonia and carbon dioxide concentrations in disposable and reusable static mouse cages. *Lab animal*, 38(1), 16-23.
- ²⁵ Green, A. R., Wathes, C. M., Demmers, T. G., MacArthur Clark, J., & Xin, H. (2008). Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia. *Journal of the american association for laboratory animal science*, 47(2), 49-56.
- ²⁶ Vogelweid, C. M., Zapien, K. A., Honigford, M. J., Li, L., Li, H., & Marshall, H. (2011). Effects of a 28-day cage-change interval on intracage ammonia levels, nasal histology, and perceived welfare of CD1 mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(6), 868-878.
- ²⁷ Ratuski, A. S., & Weary, D. M. (2022). Environmental Enrichment for Rats and Mice Housed in Laboratories: A Metareview. *Animals*, 12(4), 414.

²⁸ Bayne, K. (2018). Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. *Animal models and experimental medicine*, 1(2), 82-90.

²⁹ Olsson, I. A. S., & Dahlborn, K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Laboratory animals*, 36(3), 243-270.

³⁰ Hylander, B. L., Gordon, C. J., & Repasky, E. A. (2019). Manipulation of ambient housing temperature to study the impact of chronic stress on immunity and cancer in mice. *The journal of immunology*, 202(3), 631-636.

³¹ Fureix, C., Trevarthen, A. C., Finnegan, E. M., Bučková, K., Paul, E. S., & Mendl, M. T. (2022). Do greater levels of in-cage waking inactivity in laboratory mice reflect a spontaneous depression-like symptom? A pharmacological investigation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 212, 173311.

³² Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139-146.

³³ Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., & Garner, J. P. (2012). Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. *PloS one*, 7(3), e32799.

³⁴ Speakman, J. R., & Keijer, J. (2013). Not so hot: optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. *Molecular metabolism*, 2(1), 5-9.

³⁵ Gaskill, B. N., Winnicker, C., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). The naked truth: Breeding performance in nude mice with and without nesting material. *Applied Animal Behaviour Science*, 143(2-4), 110-116.

³⁶ Kuleskaya, N., Rauvala, H., & Voikar, V. (2011). Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. *PloS one*, 6(9), e24755.

³⁷ Windsor, Z., & Bate, S. T. (2019). Assessing the safety and suitability of nesting material for singly housed mice with surgically fitted head plates. *Heliyon*, 5(7), e02097.

³⁸ Hess, S. E., Rohr, S., Dufour, B. D., Gaskill, B. N., Pajor, E. A., & Garner, J. P. (2008). Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(6), 25-31.

³⁹ Froberg-Fejko, K. M. (2010). Benefits of providing nesting material as a form of environmental enrichment for mice. *Lab animal*, 39(10), 326.

⁴⁰ Northrup, E., Held, N., Hedrich, H. J., & Bleich, A. (2012). Mice may become caught in nesting material. *Lab Animal*, 41(6), 147-147.

- ⁴¹ Key, D. (2004). Environmental enrichment options for laboratory rats and mice. *Lab Animal*, 33(2), 39-44.
- ⁴² Kappel, S., Hawkins, P., & Mendl, M. T. (2017). To group or not to group? Good practice for housing male laboratory mice. *Animals*, 7(12), 88.
- ⁴³ Berry, A., Bellisario, V., Capoccia, S., Tirassa, P., Calza, A., Alleva, E., & Cirulli, F. (2012). Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety-and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*, 37(6), 762-772.
- ⁴⁴ Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Ceresini, G., Chirieleison, A., Panerai, A. E., & Parmigiani, S. (2003). Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 28(4), 540-558.
- ⁴⁵ Pham, T. M., Hagman, B., Codita, A., Van Loo, P. L. P., Strömmer, L., & Baumans, V. (2010). Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiology & behavior*, 99(5), 663-668.
- ⁴⁶ Arndt, S. S., Laarakker, M. C., van Lith, H. A., van der Staay, F. J., Gieling, E., Salomons, A. R., ... & Ohl, F. (2009). Individual housing of mice—impact on behaviour and stress responses. *Physiology & behavior*, 97(3-4), 385-393.
- ⁴⁷ Bisazza, A. (1981). Social organization and territorial behaviour in three strains of mice. *Italian Journal of Zoology*, 48(2), 157-167.
- ⁴⁸ Manzanares, G., Brito-da-Silva, G., & Gandra, P. G. (2018). Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.
- ⁴⁹ Brené, S., Bjørnebekk, A., Åberg, E., Mathé, A. A., Olson, L., & Werme, M. (2007). Running is rewarding and antidepressive. *Physiology & behavior*, 92(1-2), 136-140.
- ⁵⁰ Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697-709.
- ⁵¹ Slater, A. M., & Cao, L. (2015). A protocol for housing mice in an enriched environment. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (100), e52874.
- ⁵² Love, C. J., Gubert, C., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2022). Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice. *STAR protocols*, 3(4), 101689.
- ⁵³ Jennings, M., Batchelor, G. R., Brain, P. F., Dick, A., Elliott, H., Francis, R. J., ... & West, C. (1998). Refining rodent husbandry: the mouse: report of the Rodent Refinement Working Party. *Laboratory animals*, 32(3), 233-259.

- ⁵⁴ Freymann, J., Tsai, P. P., Stelzer, H., & Hackbarth, H. (2015). The amount of cage bedding preferred by female BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Animal*, 44(1), 17-22.
- ⁵⁵ Freymann, J., Tsai, P. P., Stelzer, H. D., Mischke, R., & Hackbarth, H. (2017). Impact of bedding volume on physiological and behavioural parameters in laboratory mice. *Laboratory animals*, 51(6), 601-612.
- ⁵⁶ Rosenbaum, M. D., VandeWoude, S., & Johnson, T. E. (2009). Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6), 763-773.
- ⁵⁷ Beery, A. K. (2018). Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Current opinion in behavioral sciences*, 23, 143-149.
- ⁵⁸ Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., & Capetanaki, Y. (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *The Journal of cell biology*, 134(5), 1255-1270.
- ⁵⁹ Meyer, C. W., Ootsuka, Y., & Romanovsky, A. A. (2017). Body temperature measurements for metabolic phenotyping in mice. *Frontiers in physiology*, 8, 520.
- ⁶⁰ Newsom, D. M., Bolgos, G. L., Colby, L., & Nemzek, J. A. (2004). Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(5), 13-18.
- ⁶¹ Bailoo, J. D., Murphy, E., Boada-Saña, M., Varholick, J. A., Hintze, S., Baussière, C., ... & Würbel, H. (2018). Effects of cage enrichment on behavior, welfare and outcome variability in female mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 232.
- ⁶² Van Oortmerssen, G. A. (1970). Biological significance, genetics and evolutionary origin of variability in behaviour within and between inbred strains of mice (*Mus musculus*): A behaviour genetic study. Brill Archive.
- ⁶³ Jirkof, P., Cesarovic, N., Rettich, A., & Arras, M. (2013). Housing of female mice in a new environment and its influence on post-surgical behaviour and recovery. *Applied Animal Behaviour Science*, 148(3-4), 209-217.
- ⁶⁴ Makowska, I. J., Franks, B., El-Hinn, C., Jorgensen, T., & Weary, D. M. (2019). Standard laboratory housing for mice restricts their ability to segregate space into clean and dirty areas. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- ⁶⁵ Pond, H. L., Heller, A. T., Gural, B. M., McKissick, O. P., Wilkinson, M. K., & Manzini, M. C. (2021). Digging behavior discrimination test to probe burrowing and exploratory digging in male and female mice (Vol. 99, No. 9, pp. 2046-2058).

