ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ ΓΙΟΥΛΙΑΝΑ ΚΟΝΤΙΛΙ

ΑΜ: 62113071

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη
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

Αθήνα, 2019

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DISSERTATION

STUDY ON THE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ON THE BEHAVIOR OF MALE RATS.

STUDENT NAME GIOULIANA KONTILI

CN: 62113071

NAMES OF SUPERVISORS

Dr. Voyiatzaki Chrysanthi
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 2019

Περιεχόμενα

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II.ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : Γενικό Μέρος 5

1.1 Επίμυες (rats) ως ζώα εργαστηρίου στη βιοϊατρική έρευνα 5

1.1.1 Φυλές - στελέχη 6

1.1.1.1 Επίμυες Wistar 6

1.1.1.2 Στέλεχος RccHan®: Wist 7

1.1.2 Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας 8

1.1.3 Συμπεριφορά 8

1.1.4 Αναπαραγωγή 8

1.1.5 Σύλληψη – Συγκράτηση 9

1.2 Φυσιολογική συμπεριφορά 11

1.2.1 Μη φυσιολογική συμπεριφορά 13

1.3 Εμπλουτισμός περιβάλλοντος (Environmental enrichment) 14

1.3.1 Έννοια του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος 15

1.3.2 Είδη εμπλουτισμού 15

1.3.3 Υλικά, αντικείμενα και επιδράσεις του εμπλουτισμού περιβάλλοντος 17

1.3.4 Ο προστατευτικός ρόλος του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος 19

1.3.5 Οι προβληματισμοί για τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος 20

1.3.6 Αξιολόγηση εμπλουτισμού του περιβάλλοντος 21

1.4 Κοινωνική συμπεριφορά 22

1.4.1 Μέτρηση του άγχους και της κοινωνικής συμπεριφοράς 22

1.4.1.1 Το κοινωνικό περιβάλλον ως στρεσογόνος παράγοντας 23

1.4.1.2 Πυκνότητα κλωβού 24

1.4.2 Ορισμός της Επιθετικής Συμπεριφοράς 25

1.4.2.1 Η νευροβιολογία της επιθετικής συμπεριφοράς στα τρωκτικά 26

1.4.3 Συμπεριφορά που σχετίζεται με το άγχος 28

1.4.3.1 Σχέση μεταξύ επιθετικότητας και άγχους 30

1.4.4 Σκοπός εργασίας 31

2 Υλικά και Μέθοδοι 32

2.1 Περιγραφή εγκαταστάσεων 32

2.2 Όργανα-Συσκευές-Υλικά 33

2.2.1 Πρόγραμμα NOLDUS 35

2.3 Σκοπός των Test 36

2.3.1 ΥΛΙΚΑ 37

2.4 Πειραματική διαδικασία 37

2.4.1 Πρωτόκολλο δοκιμασίας ανοιχτού εξερευνητικού πεδίου (Openfield) 37

2.4.2 Πρωτόκολλο δοκιμασίας υπερυψωμένου λαβύρινθου (Elevated Plus Maze) 39

2.4.3 Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty) 41

2.4.4 Δοκιμή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας (Social dominance tube test) 43

2.5 Πρόγραμμα διεξαγωγής δοκιμασιών 45

3 Αποτελέσματα 46

3.1 Σωματικό βάρος: Το βάρος των επίμυων μετρήθηκε εβδομαδιαίως. 46

3.2 Ο αριθμός των στροφών στο τροχό μετρήθηκε και στις τρείς ομάδες για διάστημα 30 ημερών. 47

3.3 Μέτρηση κατανάλωση τροφής 49

3.4 Συμπεριφορικά πειράματα 50

3.4.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Openfield) 50

3.4.2 Υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze) 53

3.4.3 Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty) 57

3.4.4 Δοκιμή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας (Social dominance tube test) 59

4 Συζήτηση 60

5 Βιβλιογραφία 65

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο συμπεριφορά ενός ζώου εννοούμε την αντίδραση του οργανισμού σε διάφορα ερεθίσματα που προέρχονται από το περιβάλλον του και είναι είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά, φανερά ή συγκεκαλυμμένα (1). Μια σειρά από δραστηριότητες που ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του, τις ανάγκες αυτού αλλά και το περιβάλλον μέσα στο οποίο ζει. Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος διαβίωσης των μικρών τρωκτικών που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς ενδιαφέρει τους επιστήμονες που ασχολούνται με τα ζώα αυτά. Η τοποθέτηση διαφόρων αντικειμένων, όπως η τεχνητή φωλιά, ο τροχός, η τοποθέτηση κυλίνδρων ή υλικών αναρρίχησης, δίνουν τη δυνατότητα στα ζώα να συμπεριφέρονται κατά τρόπο σχετικά ανάλογο με εκείνον των ζώων του ίδιου είδους που ζουν στο φυσικό τους περιβάλλον.

Η σωματική άσκηση μπορεί να αποτρέψει διάφορες ασθένειες και να βελτιώσει την υγεία, καθώς συνδέεται με τη μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας και με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Τα ζώα που τρέχουν έχουν χαμηλότερη αρτηριακή πίεση, μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη και πιο ευνοϊκό προφίλ λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα (2). Ο εθελοντικός τροχός χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της άσκησης και της συμπεριφοράς (3). Είναι αξιοσημείωτο, η αυθόρμητη πρόσβαση του εργαστηριακού επίμυ σε τροχούς, παρατηρείται επίσης και σε άγριους μύες όταν τοποθετούνται τροχοί στη φύση (4). Ο τροχός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των αλλαγών στη συμπεριφορά και την ικανότητα άσκησης, σε μοντέλα που νοσούν (5) ή σε γενετικά τροποποιημένους μύες (6,7). Η εθελοντική εκτέλεση τροχού μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των προσαρμοστικών αντιδράσεων στην άσκηση (8) και τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της άσκησης στις ασθένειες (5,9) ή στη γήρανση (10).

Η συμπεριφορά των επίμυων σε εθελοντικούς τροχούς είναι παρόμοια με το φυσικό μοτίβο κίνησης σε σχέση με την υποχρεωτική άσκηση (υποχρεωτική άσκηση είναι η αναγκαστική άσκηση των επίμυων στον τροχο και ορίζεται από τον ερευνητή η ταχύτητα που θα τρέχει ο επίμυς, το χρονικό διάστημα κατα την διάρκεια της μέρας, καθώς και οι μέρες της άσκησης) (11). Επίσης, η εθελοντική λειτουργία του τροχού εκτελείται υπό συνθήκες μη καταπόνησης, καθώς δεν απαιτεί αρνητικό ερέθισμα (όπως ηλεκτρικό σοκ ή άγγιγμα των ζώων, τα οποία χρησιμοποιούνται σε αναγκαστική λειτουργία διαδρόμου) (12).

Ένα άλλο πλεονέκτημα της εθελοντικής λειτουργίας του τροχού είναι ότι, εφόσον δεν απαιτείται άμεση παρέμβαση από τον ερευνητή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα σε μακροχρόνιες μελέτες (π.χ. 12 μήνες ή δια βίου άσκηση). Το κύριο μειονέκτημα της εθελοντικής λειτουργίας του τροχού είναι ότι ο ερευνητής δεν έχει τον έλεγχο της συνολικής ποσότητας άσκησης και της έντασης που εκτελείται. Ένας τρόπος για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός είναι να κατανοήσουμε τον τρόπο που μεταβάλλεται η εθελοντική δραστηριότητα σε τροχούς, καθώς και τους παράγοντες που την επηρεάζουν. Ο τροχός χρησιμοποιείται συνήθως στις μελέτες της παχυσαρκίας και της ενεργειακής ισορροπίας, παρατηρώντας τη γενική δραστηριότητα, την τάση ενός τρωκτικού να είναι περισσότερο ή λιγότερο ενεργό.

Η έκθεση σε εμπλουτισμένο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία των ζώων εργαστηρίου. Συγκεκριμένα, το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει ευεργετικές δράσεις σε επίμυες, ενισχύει ορισμένες μορφές μάθησης, στην πρόληψη και στην θεραπεία της παχυσαρκίας, του καρκίνου, της κατάθλιψης, της μειωμένης συνειδητοποίησης που σχετίζεται με τη γήρανση και των νευρολογικών διαταραχών όπως η νόσος Parkinson, της άνοιας Alzheimer, του ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και του τραυματισμού της κεφαλής και του νωτιαίου μυελού (13,14,15,16). Για την εκτίμηση της ανησυχίας ή της αμυντικής συμπεριφοράς χρησιμοποιούνται οι δοκιμές συμπεριφοράς, όπως το ανοιχτό πεδίο, ο υπερυψωμένος λαβύρινθος και οι δοκιμές κοινωνικής αλληλεπίδρασης (17,18,19). Επίσης έχει παρατηρηθεί μειωμένη αγχωτική συμπεριφορά μετά από χρόνια εκπαίδευση σε διάδρομο (20) και χρόνια άσκηση τροχού (14).

ΙΙ.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εθελοντική δραστηριότητα σε τροχούς επηρεάζεται έντονα από το φύλο, το στέλεχος, την ηλικία, το σχεδιασμό του τροχού, τη διατροφή και τις συνθήκες περιβάλλοντος, οι οποίες κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάσουν την εθελοντική περίοδο δραστηριότητας. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος της πυκνότητας στέγασης και της διαθεσιμότητας των τροχών στην συμπεριφορά και τη δραστηριότητα των αρσενικών επίμυων, μετά τον απογαλακτισμό τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ειδικός μεγάλος κλωβός με έναν τροχό, στον οποίο ήταν συνδεδεμένος ένας μετρητής στροφών. Με αυτό τον τρόπο έγινε η μέτρηση και η καταγραφή σε καθημερινή βάση της δραστηριότητας των επίμυων. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 16 αρσενικοί επίμυες του στελέχους RccHan, ηλικίας 23 ημερών. Στον κλωβό με τον τροχό βάλαμε επίμυες από την ίδια τοκετοομάδα και χωρίστηκαν ανά τετράδες. Αφού παρέμειναν στον τροχό 30 ημέρες, τα ζώα εισάγονταν στα διάφορα πειράματα, ένα-ένα, και ακολουθούν ένα εβδομαδιαίο πρόγραμμα διάρκειας 4 ημερών για την κάθε ομάδα με κάθε πείραμα να διαδέχεται το άλλο ανά ημέρα. Όλες οι δράσεις των επίμυων καταγράφηκαν σε βίντεο. Τα βίντεο αναλύθηκαν με την βοήθεια ειδικού προγράμματος καθώς και τα στατιστικά δεδομένα αυτών. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φάνηκε ότι οι επίμυες έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου: στην συνολική απόσταση που διανύθηκε στην κεντρική περιοχή του κλωβου ($P = 0.0062$), ως δείκτης κινητικότητας, στο συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε ($P=0.0434$) και στην ταχύτητα στην κεντρική περιοχή του κλωβου ($P = 0.01$) ως δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς. Ωστόσο, στην δοκιμασία υπερυψωμένου λαβύρινθου δεν υπήρξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά. Οι δύο δοκιμασίες αντικατοπτρίζουν διαφορετικές πτυχές της συναισθηματικότητας που σχετίζεται με το άγχος.

ABSTRACT

Voluntary wheel activity is strongly influenced by gender, strain, age, wheel design, nutrition and environmental conditions, which can therefore affect the voluntary operating period. The purpose of the present study is to study the effect of the enriched environment on housing density and wheel availability on the behavior and activity of male rats after weaning. For this purpose, a special large cage with a wheel was used, with a spins meter. In this way, the activity of rats was measured and recorded daily. In particular, 16 male 23-day-old RccHan strains were used. In the cage with the wheel we put rats from the same childbirth group and divided into fours. After staying in the wheel for 30 days, the animals were introduced to the different experiments, one by one, and followed a 4-day weekly schedule for each group with each experiment succeeding the other per day. All rats' actions were recorded on video. The videos were analyzed with the help of a special program and their statistics. The results showed that rats showed a statistically significant difference in the open field test: the total distance traveled to the central cage area (P = 0.0062), as an index of mobility, the total time spent (P = 0.0434) and at speed in the central region of the cage (P = 0.01) as an indicator of behavioral anxiety. However, in the elevated maze test there was no statistically significant difference. The two trials reflect different aspects of stress-related emotionality.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ : Γενικό Μέρος

1.1 Επίμυες (rats) ως ζώα εργαστηρίου στη βιοϊατρική έρευνα

Ένα από τα είδη των επίμυων, το Rattus norvegicus, χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα από τα μέσα του 1800, οδηγώντας την «μετάβαση από τους υπονόμους σε μία θέση ευγενείας, μέσω της συμβολής τους στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας και ευεξίας» όπως σε ελεύθερη μετάφραση περιέγραψε ο Lindsey (21). Ο επίμυς (rat) και συγκεκριμένα το Rattus norvegicus (καφέ επίμυς) αποτελεί το δεύτερο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είδος ζώου στην βιοϊατρική έρευνα. Οι επίμυες αποτελούν το 21% του συνόλου των ζώων που χρησιμοποιούνται, μία κάπως απατηλή εικόνα χαμηλού ποσοστού, αλλά εάν το ποσοστό αυτό προστεθεί στο ποσοστό των ποντικών (mice), αυτά τα δύο είδη αποτελούν το 88% του συνόλου των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα (22). Οι επίμυες χαρακτηρίζονται από μία πληθώρα πλεονεκτημάτων, που τους καθιστούν ιδανικά ζωικά μοντέλα. Είναι άμεσα διαθέσιμοι από πολλές εμπορικές και ιδιωτικές πηγές, χαρακτηρίζονται από γενετική ομοιομορφία, το κόστος αγοράς και συντήρησης δεν είναι μεγάλο, ο χειρισμός τους είναι σχετικά εύκολος, προσαρμόζονται σε νέα περιβάλλοντα και συνθήκες και οι φυσιολογικές τους παράμετροι είναι γνωστές, όπως και η μικροχλωρίδα τους (23). Τέλος, ο μικρός χρόνος ζωής προσδίδει την ευκαιρία μελέτης μακροχρόνιων επιδράσεων πειραματικών θεραπειών για την βελτίωση της υγείας και της καλής ζωής.

Οι επίμυες χρησιμοποιούνται στην οδοντιατρική έρευνα, στην εμβρυολογία-τερατολογία (24), στην τοξικολογία (25), στην ογκολογία (26), στην γεροντολογία (27), στην έρευνα των καρδιαγγειακών παθήσεων (28), στην ανοσολογία (29) και στην έρευνα των λοιμωδών νοσημάτων (30), ενώ υπάρχουν περίπου 50 φυλές, οι επικρατέστερες εκ των οποίων είναι οι Wistar, Spraque-Dawley και Long-Evans.

1.1.1 Φυλές - στελέχη

Σήμερα, υπάρχουν περίπου 50 φυλές, οι επικρατέστερες από τις οποίες είναι (31):

1. Wistar. Πρόκειται για φυλή μικρού σωματικού μεγέθους. Ο αλφικός επίμυς Wistar έχει λευκό τρίχωμα και δέρμα, καθώς και κόκκινα μάτια. Είναι ανθεκτικός στις ασθένειες και δεν εμφανίζει αυτόματα νεοπλάσματα.
2. Sprague-Dawley. Πρόκειται για αλφικό επίμυ μεσαίου σωματικού μεγέθους ο οποίος είναι ευαίσθητος σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Οι χειρισμοί τους είναι εύκολοι.
3. Long – Evans. Είναι μικρόσωμη φυλή με μαύρο κεφάλι και μία μαύρη λωρίδα κατά μήκος της ράχης.

Οι αμιγείς φυλές επιμύων (400) είναι λιγότερες σε σχέση με εκείνες των μυών. Από αυτές, πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι F344. M520, LEW και WAG (32).

Εικόνα 1: Απεικονίζονται οι φυλές των επιμύων.
(a) Wistar,(b)Sprague-Dawley , (c)Long-Evans
Πηγές: https://www.criver.com/products-services/find-model/long-evans-rat?region=3651
http://cmlabpro.com/rat-cells/ ,
https://www.criver.com/products-services/find-model/sas-sprague-dawley-rat?region=3651

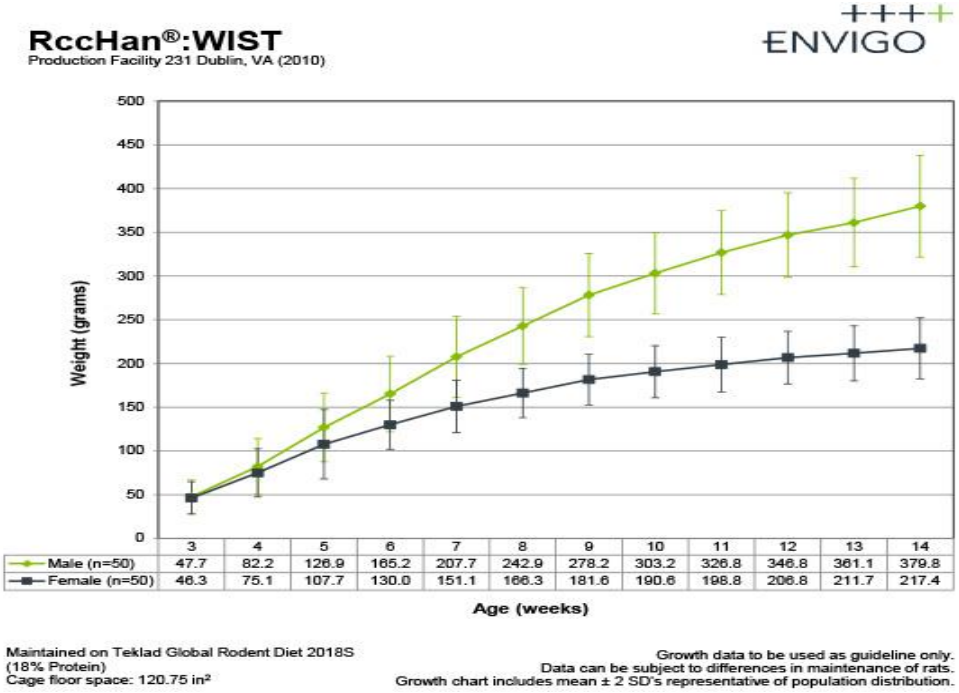
1.1.1.1 Επίμυες Wistar

Οι επίμυες Wistar, οι οποίοι ανήκουν στο γένος Rattus και στο είδος norvegicus, αποτελούν μικρού σωματικού μεγέθους φυλή αλφικών επίμυων, με λευκό τρίχωμα και δέρμα, καθώς και κόκκινα μάτια. Είναι ανθεκτικοί στις ασθένειες και δεν αναπτύσσουν αυτόματα νεοπλάσματα. Η φυλή αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Wistar, το 1906, και αποτελεί το πρώτο στέλεχος που εξυπηρέτησε ως πειραματικό μοντέλο, όταν τα εργαστήρια χρησιμοποιούσαν πρωτίστως το οικιακό ποντίκι (Mus musculus) (32).

1.1.1.2 **Στέλεχος RccHan®: Wist**

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες του στέλεχους RccHan®: Wist. Η προέλευσή του είναι από το ινστιτούτο Zentralinstitute für Versuchstierzucht, στο Ανόβερο το 1989, μεταφέρθηκε στην εταιρία Harlan Sprague-Dawley. Ο επίμυς RccHan®: WIST διατηρήθηκε από τον αρχικό πυρήνα των 156 ζευγαριών αναπαραγωγής στο Αννόβερο της Γερμανίας (33).

Η αύξηση σωματικού βάρους των επιμύων, που εκτρέφονται στα εργαστήρια πραγματοποιείται σε δύο κύρια στάδια: κατά το πρώτο στάδιο, όταν απογαλακτίζονται μέχρι την ωριμότητά τους, αναπτύσσονται όλα τα μέρη του ζώου (π.χ., κεφάλι, σώμα, άκρα, ουρά), οδηγώντας σε υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου, μετά την ωριμότητα, υπάρχει αύξηση στο σωματικό βάρος, χωρίς να συνοδεύονται από αντίστοιχες σημαντικές αλλαγές. Θεωρείται ότι η αύξηση του σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου οφείλεται σε αύξηση του σωματικού λίπους, ωστόσο, δεν έχει επαληθευτεί αυτός τον ισχυρισμός (34). Το πρώτο στάδιο φαίνεται στην καμπύλη ανάπτυξης, το σωματικό βάρος μπορεί να αναπαρασταθεί μαθηματικά ως συνάρτηση του χρόνου (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Απεικονίζεται ο μέσος όρος από τα σωματικά βάρη των αρσενικών και των θηλυκών σε συνάρτηση με την ηλικία τους (βδομάδες) (33).

1.1.2 Στοιχεία ανατομίας και φυσιολογίας

Οι επίμυες δεν φέρουν χοληδόχο κύστη, φέρουν όμως χοληδόχο πόρο. Τα επινεφρίδιά τους βρίσκονται μακριά από τα κεντρικά αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που κάνει την επινεφριδεκτομή λιγότερο επικίνδυνη στο είδος αυτό. Στον έσω κανθό του οφθαλμού τους, υπάρχει ο αδένας του Harder. Πρόκειται για τροποποιημένο δακρυϊκό αδένα, ο οποίος παράγει εκκρίσεις πλούσιες σε πορφυρίνη, οι οποίες λιπαίνουν τον οφθαλμό. Σε καταστάσεις στρες, παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του εκκρίματός του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής κόκκινης κηλίδας κάτω από τα μάτια. Το σωματικό βάρος των ενήλικων αρσενικών είναι 300-500 g και των θηλυκών 250-300 g. Ζουν 2-3 χρόνια. Η θερμοκρασία του σώματός τους είναι 37.5-38.5°C και ρυθμίζεται με τη βοήθεια ιδρωτοποιών αδένων που βρίσκονται στην πελματιαία επιφάνεια του άκρου ποδός, καθώς και με διαστολή των αγγείων της ουράς. Ο καρδιακός ρυθμός είναι 300-500 καρδιακοί παλμοί/λεπτό και ο αναπνευστικός ρυθμός 70-110 αναπνοές/λεπτό (35).

1.1.3 Συμπεριφορά

Οι επίμυες είναι φιλικά ζώα όταν δέχονται ήπιους χειρισμούς. Οι τακτικοί χειρισμοί τα καθιστούν ακόμη πιο φιλικά προς τον άνθρωπο. Έχουν συνήθως περιέργεια και τάση προς εξερεύνηση του γύρω χώρου. Θεωρούνται νυκτόβια ζώα δεδομένου ότι αναπτύσσουν δραστηριότητα κατά τις νυκτερινές κυρίως ώρες. Ωστόσο, η όρασή τους δεν είναι καλή (31).

1.1.4 Αναπαραγωγή

Η ενήβωση του επίμυος πραγματοποιείται σε ηλικία 6-8 εβδομάδων, αλλά οδηγείται σε σύζευξη σε ηλικία 12-16 εβδομάδων (ή όταν το θηλυκό φτάσει να ζυγίζει 250 g και το αρσενικό 300 g). Η διάρκεια της αναπαραγωγικής δραστηριότητας των επιμύων είναι 12-18 μήνες. Οι ωοθηκικοί κύκλοι εκδηλώνονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (πολυοιστρικό ζώο) και διαρκούν 4-5 ημέρες, ενώ το στάδιο του οίστρου 14 ώρες. Χαρακτηριστικά συμπτώματα του οίστρου είναι η υπερβολική κινητικότητα του ζώου, το τρεμούλιασμα των αυτιών του και η λήψη στάσης ζευγαρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι για τη φυσιολογική εκδήλωση της αναπαραγωγικής δραστηριότητας η φωτοπερίοδος θα πρέπει να διαρκεί

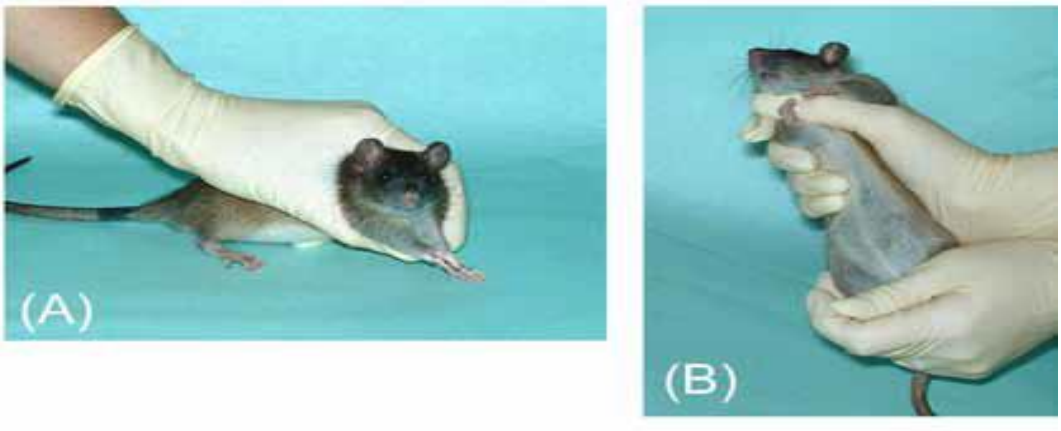
12-16 ώρες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί 21-23 ημέρες, εκτός εάν κατά τη διάρκεια της η μητέρα γαλουχεί, γεγονός που παρατείνει την εγκυμοσύνη κατά 3-7 ημέρες. Σε κάθε τοκετό γεννιούνται 6-12 νεογέννητα βάρους 5 g το καθένα. Η γαλουχία διαρκεί 21 ημέρες (36).

1.1.5 Σύλληψη – Συγκράτηση

Παρόλο που η σύλληψη του επίμυ δε θα πρέπει να γίνεται από την ουρά του γιατί υπάρχει ο κίνδυνος αποκόλλησης του δέρματός της, η τεχνική αυτή εξακολουθεί να αποτελεί έναν από τους συχνότερους τρόπους σύλληψης. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να συλλαμβάνεται από το μέσο περίπου της ουράς του και όχι από την άκρη της (εικόνα 3).

Ο επίμυς μπορεί επίσης να συλληφθεί πιάνοντάς τον πίσω από τους ώμους του και αγκαλιάζοντας το σώμα του με τα δάκτυλά μας (εικόνα 4Α). Αμέσως μετά, το ζώο φέρεται σε ύπτια θέση, με τον αντίχειρα του χεριού μας τοποθετημένο κάτω από την κάτω σιαγόνα του (εικόνα 4Β). Σε αυτή τη θέση χαλαρώνει. Θα πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε η πίεση που ασκείται από τα δάκτυλά μας να μην είναι έντονη γιατί δυσχεραίνει την αναπνοή του ζώου και επομένως προκαλεί την αντίδραση του, αλλά ούτε και μικρή γιατί υπάρχει κίνδυνος διαφυγής του. Ο χειρισμός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εξέταση, για μεταφορά του ζώου από το κλωβό του στον πάγκο εξέτασης κλπ. Ποτέ δεν θα πρέπει να επιχειρείται η μεταφορά του ζώου από χέρι σε χέρι (37).

Εικόνα 3 : Απεικονίζεται η σύλληψη του επίμυ από την ουρά (32).



Εικόνα 4 : (Α) Απεικονίζεται η σύλληψη του επίμυ πίσω από τους ώμους και (Β) η συγκράτησή του τοποθετώντας τον αντίχειρά μας κάτω από την κάτω σιαγόνα του (32).

Σε περίπτωση χειρισμού μητέρων με νεογέννητα, περιμένουμε πάντα τη μητέρα να βγει από τη φωλιά. Πριν επιχειρήσουμε να μετακινήσουμε τα νεογέννητα, μεταφέρουμε πρώτα τη μητέρα εκτός κλωβού. Πριν τη διενέργεια οποιασδήποτε επέμβασης στον επίμυ είναι σημαντικό να τον συγκρατούμε επαρκώς και με ασφάλεια. Μία τεχνική συγκράτησης είναι η ακόλουθη: συλλαμβάνεται το ζώο με το δεξί μας χέρι επιτρέποντας το κεφάλι και τους ώμους του να προβάλλουν ελαφρώς. Στη συνέχεια, συλλαμβάνεται πτυχή δέρματος του τραχήλου με το δείκτη και τον αντίχειρα του δεξιού μας χεριού, ενώ με τα υπόλοιπα δάκτυλά μας συλλαμβάνουμε το υπόλοιπο δέρμα του τραχήλου και της ράχης μέχρι τη βάση της ουράς. Στη θέση αυτή το ζώο χαλαρώνει. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για εγχύσεις φαρμάκων.

Μία άλλη τεχνική συγκράτησης που χρησιμοποιείται κυρίως για τη χορήγηση ουσιών από το στόμα είναι η ακόλουθη : τα στάδια είναι παρόμοια με την προηγούμενη τεχνική με τη διαφορά ότι στο τέλος συλλαμβάνεται το δέρμα του τραχήλου με τον αντίχειρα και το μεσαίο δάκτυλο, ενώ με το δείκτη μπορεί να ανασηκωθεί η μύτη του ζώου. Με αυτόν τον τρόπο το ζώο λαμβάνει κατακόρυφη στάση και είναι δυνατή η χορήγηση ουσιών από το στόμα (εικόνα 5) (37).

Εικόνα 5 : Απεικονίζεται η συγκράτηση του επίμυ για χορήγηση ουσιών από το στόμα (32).

1.2 Φυσιολογική συμπεριφορά

Οι κατηγορίες φυσιολογικής συμπεριφοράς των επιμύων, που αποσκοπούν στην κάλυψη των αναγκών τους, περιλαμβάνουν (39):

Συμπεριφορές συντήρησης: καλλωπισμός (grooming), κατασκευή φωλιάς (nesting), πρόσληψη τροφής (eating), πρόσληψη νερού (drinking).

Ο καλλωπισμός (grooming) των τρωκτικών περιλαμβάνει πολλές δραστηριότητες, οι κύριες είναι βιολογικές λειτουργίες που ανταποκρίνονται στη φροντίδα της επιφάνειας του σώματος. Αυτές οι λειτουργίες περιλαμβάνουν την αφαίρεση των εξωπαρασίτων και της θερμορύθμισης (40). Εκτός από αυτές τις λειτουργίες, ο καλλωπισμός είναι μια συμπεριφορά που μπορεί να προκληθεί άπο το άγχος (41,42).

Σε δοκιμασίες προτιμήσεων οι επίμυες προτιμούν τυποποιημένα εργαστηριακά κλωβοί με υλικό φωλεασμού, όπως είναι η χάρτινη χειροπετσέτα (43,44,45,46). Τα έγκυα ζώα χρησιμοποιούν επίσης υλικό για τη δημιουργία φωλιών για τον τοκετό και τη φροντίδα της τοκετοομάδας (47). Οι Dell και Rose (48) έδειξαν ότι το υλικό για κατασκευή φωλιάς, που χορηγήθηκε σε επίμυες ακόμα και πριν από την εγκυμοσύνη, επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των απογόνων. Επομένως πρέπει να υπάρχει πρόσβαση σε υλικό φωλεοποίησης όταν είναι σε νεαρή ηλικία (ακόμη και παρουσία της μητέρας τους) για να μάθουν να κατασκευάζουν φωλιά (49).

Διερευνητικές συμπεριφορές: αναρρίχηση (climbing), σκάψιμο (digging), μάσημα (chewing), όσφρηση (sniffing).

Οι επίμυες είναι επίσης έμπειροι αναρριχητές και χρησιμοποιούν αυτή τη συμπεριφορά για να ξεφύγουν από τα αρπακτικά ζώα και να τραφούν (50,51). Επίσης εξερευνούν και κοινωνικοποιούνται με άλλους επίμυες (52). Η αναρρίχηση μειώνεται καθώς μεγαλώνουν σε ηλικία (53), διότι εξερευνούν λιγότερο (54,55,56).

Οι επίμυες χρησιμοποιούν το σκάψιμο για τον ύπνο, το φαγητό και την αποθήκευση των τροφίμων και για την αναπαραγωγή τους (57,58). Το σκάψιμο επιτρέπει στους επίμυες να αποσυρθούν από τις απειλές, όπως οι άγνωστοι άνθρωποι ή οι δυνατοί θόρυβοι (59) για να κρυφτούν από το φως, το οποίο οδηγεί σε ατροφία του αμφιβληστροειδούς και τύφλωση (60,61).

Κοινωνικές συμπεριφορές (αλληλεπιδράσεις): συνωστισμός πολλών ζώων σε ένα σημείο του κλωβού (huddling together), περιποίηση μεταξύ των ζώων (grooming one another), χωροταξική οριοθέτηση μέσω της οσμής (scent/territorial marking), επιθετικότητα (aggression), άμυνα (defense), σεξουαλική συμπεριφορά (sexual behavior).

Έχει διατυπωθεί ότι ο συνωστισμός πολλών ζώων σε ένα σημείο του κλωβού (huddling together) προκύπτει από απλούς κανόνες της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ζώων (62,63,64,65).

Η περιποίηση μεταξύ των ζώων συμβάλει στην διευκόλυνση του ζευγαρώματος, αυξάνει την ανοχή μεταξύ των ζώων (66) και μειώνει την επιθετικότητα (67).

Στην φύση οι επίμυες σημαδεύουν την εδαφική περιοχή που ζούν (68) με οσμές (69,70). Τα αρσενικά ζώα το κάνουν για να αποκτήσουν πλεονεκτήματα στα πλαίσια του ανταγωνισμού μεταξύ τους και να προσελκύσουν τα θηλυκά (71). Επιπλέον, οι επίμυες μπορούν να χρησιμοποιήσουν την οσμή για να καθοδηγήσουν την πορεία τους (72,73,74).

Η επιθετική συμπεριφορά είναι κοινή σε όλα σχεδόν τα ζώα και θεωρείται λειτουργική όταν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ατόμου ή του είδους. Η επιθετικότητα είναι ένα αποτελεσματικό μέσο ανταγωνισμού για την τροφή, την επικράτηση και για το ζευγάρωμα και χρησιμεύει για την προστασία των απογόνων. Η επιθετικότητα μεταξύ δύο ζώων ενός είδους συνεπάγεται κινδύνους τόσο για το θύμα όσο και για τον θύτη. Όταν, για παράδειγμα, ένα αρσενικό επιτίθεται σε ένα θηλυκό μέλος της οικογένειας και η συμπεριφορά επίθεσης συνεχίζεται παρά τα σαφή σημάδια επιβολής ή όταν εμφανίζει επιθετικότητα που ξεπερνάει τα συμπεριφορικά πλαίσια, η συμπεριφορά

είναι παθολογική (75). Η επιθετική συμπεριφορά επιμύων αναφέρεται εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.

Όταν το απειλητικό ερέθισμα προέρχεται από ένα συγκεκριμένο ζώο, οι αμυντικές συμπεριφορές του αρουραίου έχουν τις γενικότερες αμυντικές συμπεριφορές όπως η φυγή και η ακινητοποίηση (76,77). Ένας επίμυς που αμύνεται μπορεί να δαγκώσει σχεδόν αποκλειστικά στις περιοχές του ρύγχους ενώ ένας που επιτίθεται δαγκώνει την πλάτη (76).

Στους επίμυες τα σεξουαλικά ενεργά θηλυκά και αρσενικά προκαλούν πολλά είδη ερεθισμάτων για να προσελκύσουν το αντίθετο φύλο. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατάλληλη επιλογή ενός σεξουαλικού συντρόφου γίνεται μέσω της όσφρησης (78,79).

1.2.1 Μη φυσιολογική συμπεριφορά

Η μη φυσιολογική συμπεριφορά συχνά προκύπτει όταν ένα ζώο στεγάζεται σε ένα περιβάλλον όπου εκτίθεται σε χρόνια στρεσσογόνα ερεθίσματα, όπου δεν μπορεί να εκτελέσει συμπεριφορές απαραίτητες για την αναπαραγωγή ή την επιβίωσή του, ή όταν δεν μπορεί να εκτελέσει συμπεριφορές που θα διορθώσουν την ομοιοστατική ανισορροπία που αντιμετωπίζει. Η μη φυσιολογική συμπεριφορά, λοιπόν, δεν χρησιμεύει μόνο ως δείκτης κακής ποιότητας διαβίωσης, αλλά επίσης και ως ένας δείκτης του στρες και της έλλειψης ομοιόστασης (80).

Κανιβαλισμός (Cannibalism): Ο κανιβαλισμός αποτελεί μια παθολογική συμπεριφορά των ζώων εργαστηρίου και χαρακτηρίζεται από την επιθετική συμπεριφορά που ασκούν οι γονείς στα νεογνά με αποτέλεσμα το θάνατο των τελευταίων. Στον εργαστηριακό χώρο αυτό είναι ανεπιθύμητο και θεωρείται συχνά ως μη φυσιολογική μητρική συμπεριφορά. Υπάρχουν πολλές περιβαλλοντικές επιρροές που μπορούν να προκαλέσουν την συμπεριφορά αυτή, όπως η έλλειψη τροφής ή η παρουσία κάποιου είδους απειλής, ο θόρυβος υψηλής συχνότητας, ο τραχύς χειρισμός, το συχνό καθάρισμα κλωβού, μια άγνωστη τεχνική ή αδικαιολόγητη κίνηση του κλωβού με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στην ανατροφή των νεογνών (81). Επίσης η σχετική περίσσεια βιταμίνης Β1 ή μαγγανίου (αλλά όχι και των δύο μαζί) αναφέρεται ότι προδιαθέτει στον κανιβαλισμό (82).

Στερεοτυπίες (Stereotypies): Οι στερεοτυπίες ορίζονται ως μια σειρά από επαναλαμβανόμενες κινήσεις (83) ή / και στάσεις του σώματος που στερούνται κάθε στόχο ή λειτουργία (84,85,86) και το ζώο φαίνεται ότι έχει δυσκολία να σταματήσει την εκτελεσή τους (87). Αποτελούν εκδήλωση μη φυσιολογικής συμπεριφοράς, υπό την έννοια ότι δεν

ανήκουν στο φάσμα των φυσιολογικών συμπεριφορών των τρωκτικών. Οι στερεοτυπίες εμφανίζονται από εξωτερικά ερεθίσματα (88,89). Με τον καιρό, όμως μπορεί να γίνουν ανεξάρτητες από το ερέθισμα που αρχικά τις προκάλεσε (90,91). Συνήθως είναι αποτέλεσμα κακών συνθηκών διαβίωσης και προκαλούνται σε κλωβοί με χαμηλή πολυπλοκότητα περιβάλλοντος. Δεν προκαλούνται όλες από το περιβάλλον όμως, μερικές είναι αποτέλεσμα εγκεφαλικής βλάβης ή ψυχιατρικών καταστάσεων (92), και άλλες από φάρμακα όπως d-αμφεταμίνη (93). Οι στερεοτυπίες στους επίμυες περιλαμβάνουν: α) μάσημα της σήτας του κλωβού, β) άλματα (το ζώο ανορθώνεται στα πίσω του πόδια και εκτελεί κατ' επανάληψη κατακόρυφα άλματα). Στερεοτυπίες με λιγότερο συχνή εμφάνιση περιλαμβάνουν "τούμπες" και άλλες άσκοπες επαναλαμβανόμενες κινήσεις. Τέλος, οι συνθήκες στέγασης στις οποίες αναπτύσσονται στερεοτυπικές συμπεριφορές θα πρέπει να αποφεύγονται, καθώς ενδέχεται να έχουν βιολογική σημασία για τα ζώα (94).

1.3 Εμπλουτισμός περιβάλλοντος (Environmental enrichment)

Η διασφάλιση της υγείας και της ευζωίας των ζώων εργαστηρίου, εκτός από τη χορήγηση τροφής, νερού και καθαρής στρωμνής, περιλαμβάνει και τη δυνατότητα για εκδήλωση έμφυτων ικανοτήτων τους όπως για παράδειγμα η κατασκευή φωλιάς ή η προστασία τους από διάφορους περιβαλλοντικούς κινδύνους, καθώς και η εξερεύνηση του περιβάλλοντος.

Τα ζώα γεννιούνται μέσα στο εργαστήριο, όμως έχουν τις ίδιες συνήθειες και συμπεριφορές με αυτές των ζώων του ίδιου είδους που γεννιούνται ελεύθερα στη φύση (95). Βελτιώνοντας το περιβάλλον στέγασης των ζώων, πέρα από τις τυποποιημένες συνθήκες στέγασης, δίνεται η δυνατότητα στα ζώα να είναι πιο κοντά στο «φυσικό τους περιβάλλον», διασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την ψυχική τους υγεία αλλά και την ευζωία τους.

Το περιβάλλον στέγασης των ζώων είναι ένα σύνολο από ερεθίσματα και αλληλεπιδράσεις που έχουν σχέση με την παρουσία άλλων ζώων του ίδιου είδους, την παρουσία του ανθρώπου, τον θόρυβο, το φως, το είδος της στρωμνής, το μέγεθος του κλωβού, τον αερισμό και την ποιότητα του εισπνεόμενου αέρα καθώς και την ύπαρξη διάφορων υλικών ή αντικειμένων (96).

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος χρησιμοποιείται σε διάφορα ερευνητικά πρωτόκολλα σε διάφορους τομείς όπως της Νευροβιολογίας, της Ανοσολογίας και σε συμπεριφορικές μελέτες.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει κατανόηση της έννοιας του περιβαλλοντικού εμπλουτισμού και των ειδών του καθώς και του τρόπου χρησιμοποίησής του με την τοποθέτηση ή μη διαφόρων αντικειμένων.

1.3.1 Έννοια του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος

Ως εμπλουτισμός περιβάλλοντος θεωρείται κάθε αλλαγή του περιβάλλοντος στέγασης των ζώων εργαστηρίου, που έχει σκοπό να δώσει τη δυνατότητα στο στεγαζόμενο ζώο να εκδηλώσει συμπεριφορά παρόμοια με αυτή των ζώων του ίδιου είδους που ζούν ελεύθερα στο φυσικό περιβάλλον. Μέσω του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος βελτιώνεται η βιολογική λειτουργία του πειραματοζώου, ενισχύεται η φυσιολογική του συμπεριφορά και αυξάνεται η ικανότητά του όσον αφορά στην προσαρμογή σε συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές (97). Η έννοια του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στα πειραματόζωα δεν περιλαμβάνει ένα σαφή ορισμό και πολλές φορές χρησιμοποιείται εσφαλμένα, υποδηλώνοντας απλώς την τοποθέτηση ενός ή περισσοτέρων αντικειμένων στον κλωβό των πειραματοζώων (98).

1.3.2 Είδη εμπλουτισμού

Το 1991 ο Bloomsmith κατηγοριοποίησε τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος στέγασης των ζώων εργαστηρίου στα παρακάτω (99):

Κοινωνικός εμπλουτισμός (social enrichment) είναι η δυνατότητα που προσφέρεται στα ζώα εργαστηρίου να έρχονται σε επαφή, άμεση ή έμμεση, με άλλα ζώα του ίδιου είδους και της ίδιας φυλής.

Ως άμεσος κοινωνικός εμπλουτισμός (social contact enrichment) θεωρείται η στέγαση των ζώων σε ομάδες. Αυτό προϋποθέτει τα ζώα να μην αναπτύσσουν επιθετικές ή ανταγωνιστικές συμπεριφορές και να ζουν αρμονικά μεταξύ τους.

Ως έμμεσος κοινωνικός εμπλουτισμός (social non-contact enrichment) θεωρείται η δυνατότητα που έχουν τα ζώα να μυρίζουν ή και να βλέπουν άλλα ζώα του ίδιου είδους, τα οποία στεγάζονται σε διαφορετικούς κλωβούς στην ίδια αίθουσα. Αυτό πραγματοποιείται

συνήθως, σε περιπτώσεις που τα ζώα δεν μπορούν να συστεγαστούν στον ίδιο κλωβό λόγω επιθετικότητας ή ανταγωνιστικότητας (96).

Φυσικός εμπλουτισμός (physical enrichment) είναι οποιαδήποτε παρέμβαση που πραγματοποιείται στο περιβάλλον στέγασης των ζώων, που ως αποτέλεσμα έχει την ανάπτυξη και την ικανοποίηση των φυσιολογικών συνηθειών και αναγκών του.

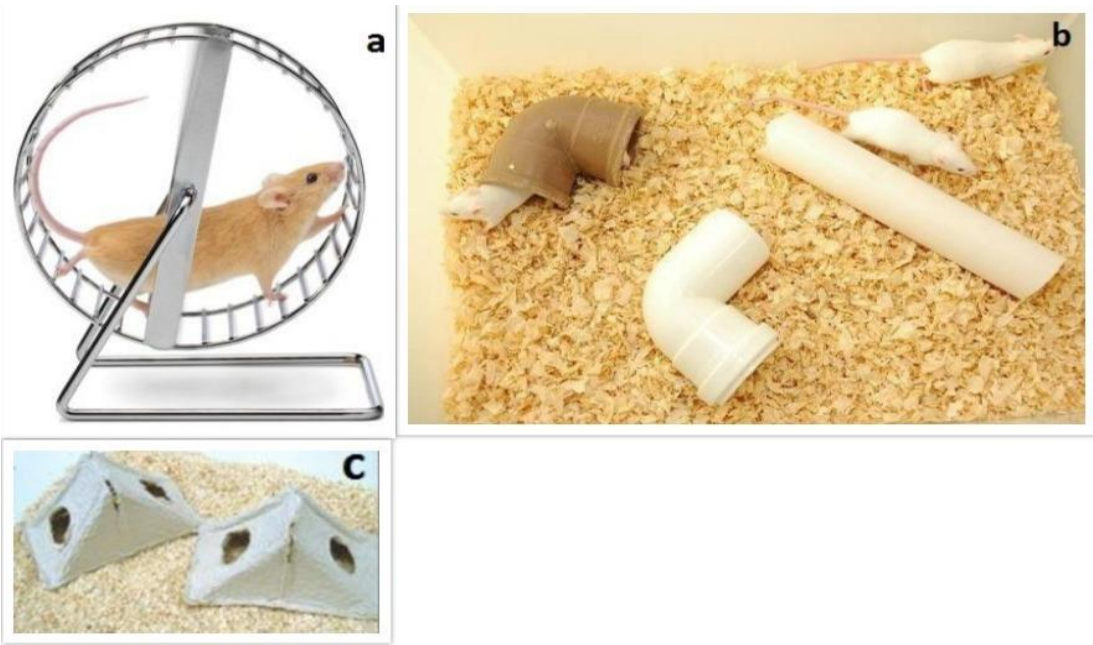
Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την τοποθέτηση διαφόρων υλικών ή αντικειμένων μέσα στο κλωβό στέγασης των ζώων που ως αποτέλεσμα θα έχει τη δημιουργία ενός σύνθετου και ελκυστικού περιβάλλοντος (complex environment). Τέτοιο περιβάλλον δίνει στα ζώα τη δυνατότητα για άσκηση, εξερεύνηση του περιβάλλοντος, για ανεύρεση της τροφής τους, για την κατασκευή φωλιάς για να γεννήσουν ή για να προστατευτούν από άλλα ζώα της ομάδας που μπορεί να είναι επιθετικά ή άλλους παράγοντες όπως είναι το έντονο φως ή το ρεύμα αέρα ειδικά για τις περιπτώσεις των ατομικά αεριζόμενων κλωβών (individual ventilated cages-IVC).

Στην κατηγορία του φυσικού εμπλουτισμού ανήκει και η πρόκληση ερεθισμάτων όπως είναι τα αισθητικά (sensory enrichment), όπως για παράδειγμα η μουσική ή τα διατροφικά (nutritional enrichment), όπως η χορήγηση τροφής μέσα σε ειδικά διαμορφωμένο κουτί (100).

Ένας από τους απλούστερους τρόπους φυσικού εμπλουτισμού είναι η τοποθέτηση χάρτινης χειροπετσέτας μέσα στον κλωβό. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η ευκαιρία στα ζώα να φτιάξουν τη φωλιά τους, που είναι μια απαραίτητη διαδικασία ειδικά πριν τον τοκετό (97). Ακόμη, τοποθετώντας ένα σπιτάκι για τρωκτικά μπορεί να προστατευτούν από διάφορους εξωτερικούς ή εσωτερικούς παράγοντες όπως αναφέρθηκαν παραπάνω.

Άλλα αντικείμενα ή υλικά που χρησιμοποιούνται ως φυσικός εμπλουτισμός είναι ο τροχός κύλισης (running wheel), σκάλες (ladders) που προάγουν τη δυνατότητα άσκησης των ζώων και τούνελ (tunnels) που θα αναφερθούν στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Στην εικόνα 6 απεικονίζονται διάφορα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται για τον φυσικό εμπλουτισμό του περιβάλλοντος στεγαζόμενων ζώων.



Εικόνα 6 : Απεικονίζονται a) ένας τροχός κύλισης
b) πλαστικοί σωλήνες ως τούνελ, c) χάρτινα σπίτια τρωκτικών
Πηγές: http://www.stockphotos.ro/mouse-hamster-exercise-wheel-image13758830.html
http://www.enecienciasanais.uff.br/index.php/ivenecienciassubmissao/eneciencias2012/paper/viewFile/413/284

1.3.3 Υλικά, αντικείμενα και επιδράσεις του εμπλουτισμού περιβάλλοντος

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος παρέχει στα ζώα πολλές ευκαιρίες αλληλεπίδρασης με σύνθετα άψυχα και κοινωνικά ερεθίσματα, τα οποία τους δίνουν την δυνατότητα να εξερευνούν το περιβάλλον (101). Θεωρείται ως μια συνεχής ενίσχυση της γνωστικής και σωματικής τους δραστηριότητας (102). Η συνεχής εισαγωγή νέων ερεθισμάτων προσφέρει στα ζώα εργαστηρίου αισθητικές και γνωστικές εμπειρίες. Η τοποθέτηση σχοινιού (ropes), σκάλας (ladder), τροχού κύλισης (running wheel), τούνελ (tunnels) ή και γεφυρών (bridges) όχι μόνο τους δίνει την ευκαιρία για άσκηση, αλλά τα βοηθά και να ενισχύσουν την ακροβατική τους διάθεση (103).

Τα ζώα σε εμπλουτισμένο περιβάλλον στεγάζονται σε μεγάλους κλωβούς και συνήθως σε ομάδες των 6 – 12 ζώων προσφέροντας τους την δυνατότητα για κοινωνικό εμπλουτισμό και κοινωνικοποίηση των ζώων (104,105). Η σημαντικότητα της κοινωνικής ενίσχυσης έχει

άλλωστε αναγνωριστεί από πολλές μελέτες που δείχνουν το αρνητικό αποτέλεσμα της απομόνωσης των ζώων όσον αναφορά στη συμπεριφορά τους (96).

Έρευνες έδειξαν ότι ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μορφολογικές νευροβιολογικές και συμπεριφορικές αλλά και φυσιολογικές αλλαγές στα ζώα (107,108). Το περιβάλλον στέγασης μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά τη συμπεριφορά των ζώων. Συμβάλλει στη βελτίωση της γονιμότητας των θηλυκών ζώων, στην πρόληψη παθολογικής συμπεριφοράς, όπως στερεοτυπικές κινήσεις, στη μείωση της επιθετικότητας μεταξύ αρσενικών ζώων (96), στη μείωση του άγχους (109) και στην ανάκαμψη από εγκεφαλικές βλάβες (110).

Ένα εμπλουτισμένο περιβάλλον είναι ευεργετικό για την ευημερία και την ευζωία των στεγαζόμενων ζώων. Για παράδειγμα, στα ζώα που έχουν τη δυνατότητα να ασκούνται με τη βοήθεια τροχού κύλισης παρατηρείται μείωση του βάρους τους, μείωση της πίεσης αίματος και αύξηση του μέσου όρου διαβίωσής τους (96). Γενικά, ο εμπλουτισμός περιβάλλοντος αυξάνει και καλυτερεύει τον μέσο όρο διαβίωσης των ζώων και γι' αυτό άλλωστε προτείνουν να χρησιμοποιείται ο εμπλουτισμός από την νεαρή ηλικία (111).

Ένα σημαντικό μειονέκτημα των μελετών που χρησιμοποιούν το συμπεριφορικό πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος έγκειται στο γεγονός ότι δεν πραγματοποιείται ηλικιακός διαχωρισμός των πειραματόζωων καθώς επίσης και ότι δεν αναφέρεται ο χρόνος παραμονής του πειραματόζωου στον κλωβό εμπλουτισμένου περιβάλλοντος (98). Επιπροσθέτως, οι μελέτες που αφορούν σε νευροψυχιατρικές νόσους, αφήνουν τα πειραματόζωα να διαβιώνουν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς, όπου παρέχονται ελάχιστα ερεθίσματα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο ερώτημα, εάν οι περισσότερες εργαστηριακές συνθήκες διαβίωσης των πειραματόζωων αντικατοπτρίζουν το φυσικό τους περιβάλλον και δεν αποτελούν ένα περιβάλλον που στην ουσία στερείται ερεθισμάτων και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για ιατρική έρευνα.

Το εμπλουτισμένο περιβάλλον εξ ορισμού ποικίλει σύμφωνα με τα πρωτόκολλα διαφόρων εργαστηρίων. Ως κλασσικό περιβάλλον, ορίζονται οι τυπικοί εργαστηριακοί κλωβοί και ως εμπλουτισμένο περιβάλλον, οι μεγαλύτεροι εργαστηριακοί κλωβοί με το πλήθος ερεθισμάτων και την ευκαιρία για κοινωνική συναναστροφή. Τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν το εμπλουτισμένο περιβάλλον διαφέρουν ως προς τη σύνθεση, το σχήμα, το χρώμα ή ακόμα και την οσμή (98), οπότε δεν μπορούμε να αναφερθούμε σε έναν τυποποιημένο κλωβό εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, ο οποίος να

θεωρείται κατάλληλος ώστε να αντικατοπτρίσει τις ευεργετικές επιδράσεις σε επίπεδο εγκεφάλου και συμπεριφοράς. Μελέτες που αναφέρονται στις επιδράσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος σε διάφορες εγκεφαλικές διαταραχές, έχουν χρησιμοποιήσει πληθώρα μεθοδολογικών συνθηκών. Σημαντική παράμετρος που αφορά στην περιβαλλοντική πολυπλοκότητα, φαίνεται να είναι η χρήση διαφορετικών αντικειμένων, δίνοντας τη δυνατότητα οπτικών, σωματοκινητικών και οσφρητικών ερεθισμάτων. Άλλη εξίσου σημαντική παράμετρος του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, αποτελεί και η αντικατάσταση των αντικειμένων με καινούργια, καθώς επίσης και η αλλαγή της θέσης τους, πράγμα το οποίο οδηγεί σε περαιτέρω γνωσιακή διέγερση, μέσω του σχηματισμού χωρικών χαρτών. Όλες αυτές οι παράμετροι συντελούν σε υψηλά επίπεδα διέγερσης λόγω πληθώρας ερεθισμάτων, σε αυξημένη φυσική άσκηση, και είναι άμεσα σχετιζόμενες με την αντίδραση των διάφορων ζωικών μοντέλων στο εμπλουτισμένο περιβάλλον (112).

Αυξάνοντας το μέγεθος και την πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος, παρέχεται η ευκαιρία στα πειραματόζωα να αναπτύξουν ή να αυξήσουν διάφορες γνωσιακές συμπεριφορές και νευρικές λειτουργίες (113). Αναφερόμαστε συνεπώς στη μελέτη της επίδρασης της αύξησης της πολυπλοκότητας, η οποία μειώνει τις μη φυσιολογικές συμπεριφορές και προάγει συμπεριφορές συγκεκριμένες για κάθε είδος ζώου οδηγώντας στην ευημερία των πειραματόζωων. Η έρευνα με το πειραματικό πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος έχει οδηγήσει σε μεγάλη πρόοδο τις μελέτες που αφορούν τις επιδράσεις του περιβάλλοντος σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Διεξάγονται αυστηροί πειραματικοί σχεδιασμοί των μελετών, με κύριο σκοπό την αποσαφήνιση των θετικών επιδράσεων που έχει το περιβάλλον, δίνοντας κατά αυτό τον τρόπο νέες προοπτικές στους μηχανισμούς πλαστικότητας του εγκεφάλου που περιλαμβάνουν τη νευρογένεση, την αύξηση της συναπτικής πλαστικότητας και τη σημασία της στη γήρανση και στις νευροεκφυλιστικές νόσους (114,115,98).

1.3.4 Ο προστατευτικός ρόλος του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι μη τυποποιημένες συνθήκες στέγασης έχουν προστατευτικό ρόλο από διάφορους ψυχογενείς και νευρογενείς στρεσογόνους παράγοντες. Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος είναι σε θέση να προστατεύσει τα ζώα από το

υπερβολικό άγχος και στρες ως απάντηση στη παρουσία ενός στρεσογόνου παράγοντα, αλλά και να εξασθενεί επιδράσεις του παρελθόντος σταθερές ή επίμονες που προκλήθηκαν από κάποιον ψυχογενή στρεσογόνο παράγοντα, όπως το προγεννητικό στρες ή το στρες κατά τον απογαλακτισμό των νεογέννητων από τη μητέρα τους (111). Έτσι, καταφέρνει να αντιστρέψει τις επιζήμιες επιπτώσεις του προγεννητικού στρες, αυξάνοντας την κοινωνική αλληλεπίδραση, μειώνοντας την έκκριση κορτικοστερόνης και της αδρεναλίνης στο πλάσμα ζώων που χρήζουν επαναλαμβανόμενου χειρισμού προστατεύοντάς τα από το στρες και το άγχος.

Οι επιδράσεις του εμπλουτισμού μπορούν να μετρηθούν είτε μέσω της μέτρησης διαφόρων ορμονών (αδρενοκορτικοτροπίνη Adrenocorticotropic Hormone (ACTH), κορτικοστερόνη Corticosterone, αδρεναλίνη Adrenaline) είτε μέσω συμπεριφορικών δοκιμασιών υπό την επίδραση κάποιου ψυχογενούς στρεσογόνου παράγοντα ή νευρογενούς παράγοντα (111). Τέτοιες συμπεριφορικές δοκιμασίες είναι του ανοιχτού πεδίου (open field), του υπερυψωμένου λαβύρινθου (elevated plus maze), του φωτεινού/σκοτεινού κουτιού (light/dark box), της δοκιμασίας της ακετόνης (test acetone) καθώς και άλλες δοκιμασίες, με τις οποίες παρατηρείται η συμπεριφορά του ζώου ως προς την έλλειψη του φόβου, του άγχους και του στρες για κάτι καινούργιο και παράλληλα παρατηρείται αύξηση της περιέργειας και της εξερεύνησης.

Είναι λοιπόν σαφές ότι ο εμπλουτισμός έχει θεραπευτικό και προστατευτικό ρόλο κατά του άγχους και του στρες βοηθώντας τα ζώα: (α) να αντιμετωπίσουν μια επικείμενη απειλή, (β) να υπομένουν επιπτώσεις προηγούμενων στρεσογόνων παραγόντων και (γ) σε μετέπειτα στρεσογόνους παράγοντες (111).

1.3.5 Οι προβληματισμοί για τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος

Ένας από τους προβληματισμούς που απασχολεί του επιστήμονες είναι για το αν ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος στέγασης των ζώων συμβάλλει στην ευζωία και στην ευημερία των ζώων και κατ’ επέκταση βελτιώνει την ποιότητα των ερευνητικών αποτελεσμάτων (96).

Όπως ειπώθηκε και σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, ο εμπλουτισμός δεν θα πρέπει να δημιουργεί εντάσεις μεταξύ των συστεγαζόμενων ζώων ούτε να αναπτύσσεται

ανταγωνιστική και επιθετική διάθεση, διότι τότε αυτή η κατάσταση φέρει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό που επιδιώκεται. Βασικός κανόνας είναι ο σχεδιασμός της οποιασδήποτε παρέμβασης στο περιβάλλον στέγασης των ζώων να γίνεται προσεκτικά και υπεύθυνα και να μην τοποθετείται τίποτα αυθαίρετα μόνο και μόνο επειδή θεωρείται ελκυστικό ενώ στην πραγματικότητα μπορεί να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως για παράδειγμα να στρεσάρει τα ζώα.

Διαφορετικά αντικείμενα παρέχουν διαφορετικούς τύπους εμπειριών στα ζώα όπως γνωστικές, κοινωνικές, ακροβατικές ή αισθητηριακές εμπειρίες. Σε κάποιες μελέτες χρησιμοποιούνται παιχνίδια, ενώ σε άλλες χρησιμοποιούνται τροχοί κύλισης, σκάλες ή και τούνελ (111).

Επομένως ο σωστός σχεδιασμός, η αυστηρή επιλογή και η κατάλληλη τοποθέτηση αντικειμένων εντός του περιβάλλοντος στέγασης των ζώων συμβάλλει σε ένα σύνθετο περιβάλλον διαβίωσης του ζώου φέροντας ποιοτικά και σωστά αποτελέσματα στην έρευνα, βελτιώνοντας τη ζωή τους και αποφεύγοντας ανεπιθύμητες συμπεριφορές (96).

1.3.6 Αξιολόγηση εμπλουτισμού του περιβάλλοντος

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος των ζώων είναι ένα σημαντικό θέμα και μέρος του συνολικού προγράμματος διαχείρισης των ζώων εργαστηρίου και πρέπει να είναι καλά σχεδιασμένος ώστε να ωφελεί τα ζώα του εργαστηρίου και να μην επηρεάζει τα ερευνητικά αποτελέσματα αρνητικά (96). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations- FELASA) επιδιωκόμενο αποτέλεσμα του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος στέγασης των ζώων είναι η βελτίωση της ευζωίας τους, η διασφάλιση της υγείας τους αλλά και η διασφάλιση της ποιότητας των ερευνητικών αποτελεσμάτων. Πρέπει να προάγει την ανάπτυξη και την εκδήλωση φυσιολογικής συμπεριφοράς των στεγαζόμενων ζώων, να μην τα αγχώνει, να μην τα φοβίζει, να είναι εύκολος στην υλοποίηση του, να γίνεται εύκολα και γρήγορα αποδεκτός από το ζώο και κυρίως να δίνει τη δυνατότητα στο ζώο αν επιθυμεί να απορρίψει ή να προσαρμοστεί σύμφωνα με τις επιθυμίες του (116,117). Επίσης υπάρχουν διεθνείς επιστημονικοί οργανισμοί που προωθούν και υποστηρίζουν την ανάπτυξη και την εφαρμογή προγραμμάτων εμπλουτισμού του περιβάλλοντος καθώς και η Ευρωπαϊκή και Διεθνής Νομοθεσία (118).

Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να αξιολογηθεί ένα πρόγραμμα εμπλουτισμού είναι με την άμεση παρατήρηση των ζώων μέσα στον κλωβό, με την μέτρηση διαφόρων παραμέτρων 'όπως την κατανάλωση της τροφής και του νερού ή την μεταβολή του σωματικού βάρους τους, την μέτρηση διαφόρων ορμονών στον ορό του αίματος τους, με συμπεριφορικές δοκιμασίες και με τον έλεγχο προτίμησης τους για τη χρησιμοποίηση ενός αντικειμένου ή υλικού σε σχέση με κάποιο άλλο (119,120).

1.4 Κοινωνική συμπεριφορά

Το κοινωνικό περιβάλλον συνήθως περιλαμβάνει σωματική επαφή και επικοινωνία μεταξύ των μελών του ίδιου είδους, αν και μπορεί να περιλαμβάνει επικοινωνία μεταξύ των ζώων μέσω οπτικών, ακουστικών και οσφρητικών σημάτων. Όταν αυτό είναι κατάλληλο και συμβατό με το πρωτόκολλο, τα κοινωνικά ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε φυσική επαφή. Ένα κοινωνικό ζώο θα μπορούσε να μετριάσει τις επιδράσεις μιας αγχωτικής κατάστασης, να μειώσει την μη φυσιολογική συμπεριφορά, να αυξήσει την δυνατότητα για άσκηση. Η κατανόηση της κοινωνικής συμπεριφοράς των ζώων θα διευκολύνει την επιτυχή κοινωνική στέγαση. Η κοινωνική στέγαση όμως, μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα τραυματισμών των ζώων λόγω μάχης και να αλλάξει συμπεριφορικές και φυσιολογικές λειτουργίες.

1.4.1 Μέτρηση του άγχους και της κοινωνικής συμπεριφοράς

Οι επιδράσεις της έκθεσης στο στρες εξαρτώνται από τη φύση του στρες, τη διάρκεια (οξεία ή χρόνια), το φύλο, τη γενετική, το χρόνο έκθεσης (πρώιμη ζωή, εφηβική ηλικία, ενηλικίωση ή γήρανση) (121,122,123). Το άγχος μπορεί να εκτιμηθεί τόσο από τους συμπεριφορικούς όσο και από τους φυσιολογικούς δείκτες. Μία από τις πιο συχνά μετρηθείσες άμεσες φυσιολογικές αποκρίσεις στο στρες είναι η ενεργοποίηση άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA). Κατά τη διάρκεια στρεσογόνων συμβάντων, η κορτικοτροπίνη (CRF ή CRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και είναι ο κύριος παράγοντας έκκρισης της αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (αδενοϋπόφυση) (124).

Η κοινωνική συμπεριφορά είναι περίπλοκη και ποικίλλει ανάλογα με την επιλεγμένη συμπεριφορική δοκιμασία και εάν τα ζώα εξετάζονται με ζώα ίδιου ή με αντίθετου φύλου ή

με γνωστά ή άγνωστα στελέχη. Το εργαστηριακό περιβάλλον είναι ένα απλουστευμένο περιβάλλον σε σύγκριση με την πολυπλοκότητα της φύσης. Ορισμένες έρευνες αποσκοπούν στην ποσοτικοποίηση της κοινωνικής συμπεριφοράς σε σύνθετες περιοχές στέγασης (125). Άλλες έρευνες βασίζονται σε περιορισμένες κοινωνικές αλληλεπιδράσεις, σε δοκιμές που αποσκοπούν στη μέτρηση ορισμένων ιδιαίτερων πτυχών της κοινωνικής συμπεριφοράς (126). Για παράδειγμα, οι δοκιμές κοινωνικής αλληλεπίδρασης συνήθως μετράνε τον χρόνο που αφιερώνεται στην κοινωνική επαφή. Οι δοκιμασίες κοινωνικής επιλογής λαμβάνουν χώρα σε συσκευές πολλαπλών θαλάμων που επιτρέπουν τη διερεύνηση είτε ενός ειδικού είτε ενός μη ζωντανού ερεθίσματος όπως ένα νέο αντικείμενο (127). Χρησιμοποιούνται συχνά δοκιμές για την αξιολόγηση της κοινωνικής αναγνώρισης και της μνήμης για οικεία άτομα (128). Τα κοινωνικά κίνητρα μπορούν να αξιολογηθούν με μέτρα προσπάθειας που καταβάλλονται για την πρόσβαση σε ένα άλλο άτομο ή την θέση του κοινωνικού περιβάλλοντος (129). Άλλες δοκιμές μετρούν συγκεκριμένες πτυχές της κοινωνικής ικανότητας, όπως η μνήμη και τα κοινωνικά συμπεράσματα που εμπλέκονται στην ιεραρχία (130). Πρόσφατες μελέτες κοινωνικής συμπεριφοράς σε επίμυες έχουν επικεντρωθεί στην καθυστέρηση της απελευθέρωσης ενός συγκρατημένου επίμυ κάτω από διαφορετικά σενάρια (131,132).

Δύο νευροπεπτίδια έχουν εμπλακεί σε πολλές πτυχές της κοινωνικής συμπεριφοράς των θηλαστικών: οξυτοκίνη (oxytocin OT) και αργινίνη-βασοπρεσίνη (arginine-vasopressin AVP). Η οξυτοκίνη παράγεται στον υποθάλαμο και διευκολύνει μια ευρεία ποικιλία διαδικασιών που σχετίζονται με την κοινωνική συμπεριφορά, συμπεριλαμβανομένης της μητρικής συμπεριφοράς, της εμπιστοσύνης και του σεξουαλικού δεσμού (133,134,135,136). Οι θέσεις και οι πυκνότητες των υποδοχέων της ωκυτοκίνης (oxytocin receptors OTR) και των υποδοχέων τύπου 1a της βασοπρεσίνης (vasopressin type 1a receptors V1aR) έχουν συσχετιστεί με μεμονωμένες παραλλαγές της κοινωνικής συμπεριφοράς στην επιθετικότητα (137 ,138).

1.4.1.1 Το κοινωνικό περιβάλλον ως στρεσογόνος παράγοντας

Στα τρωκτικά, το πιο σημαντικό μοντέλο αγχωτικής κοινωνικής αλληλεπίδρασης είναι η κοινωνική ήττα. Η κοινωνική ήττα μπορεί να έχει πιο ουσιαστικό αντίκτυπο στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των αρσενικών τρωκτικών σε σχέση με τους ευρέως

χρησιμοποιούμενους στρεσογόνους παράγοντες όπως η συγκράτηση, το ηλεκτρικό σοκ και το χρόνιο μεταβλητό ήπιο στρες (139,140,141). Βραχυπρόθεσμα, η κοινωνική ήττα προκαλεί αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό, την έκκριση ορμονών και τη θερμοκρασία του σώματος, με μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της δραστηριότητας, της κοινωνικής συμπεριφοράς, της ευαισθησίας στις ασθένειες (142,143). Σε αντίθεση με το φυσικό στρες, όπως η συγκράτηση, η κοινωνική ήττα δεν φαίνεται να συνηθίζεται από τα ζώα (144) και μπορεί να δημιουργηθεί σε ομάδες με ένα μόνο κυρίαρχο άτομο (145). Το άγχος της κοινωνικής ήττας έχει βαθιές επιδράσεις στη μορφολογία και τη λειτουργία του ιππόκαμπου (146,147). Η κοινωνική ήττα μεταβάλλει επίσης την αναλογία μεταλλοκορτικορτικοειδών προς υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών στον ιππόκαμπο (148). Στις νευροβιολογικές έρευνες, η προσοχή επικεντρώνεται στους νευρώνες, ως εγκεφαλικοί μεσολαβητές της βιολογικής ενσωμάτωσης του κοινωνικού ερεθίσματος. Ωστόσο, μετά από πρόσφατες αναφορές σχετικά με τις επιπτώσεις του κοινωνικού στρές έχει καταστεί σαφές ότι τα νευρογλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδεντροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα), είναι πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία (149). Η κοινωνική ιεραρχία έχει επίσης εξερευνηθεί σε περιβάλλοντα σε κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν σε συνεχή βάση (150,151). Αν και δεν είναι ακόμη σαφές πώς το κοινωνικό στρες επιδρά στους επίμυες, πρέπει να εξεταστεί η κοινωνική υποταγή με ποιο τρόπο επηρεάζει τα εμπλεκόμενα ζώα.

1.4.1.2 Πυκνότητα κλωβού

Η πυκνότητα στο κλωβό επηρεάζει τη συμπεριφορά των τρωκτικών. Τόσο τα συνωστισμένα όσο και τα απομονωμένα κοινωνικά περιβάλλοντα χρησιμοποιούνται ως παράγοντες άγχους στα τρωκτικά. Η συσσώρευση είναι παράγοντας άγχους ειδικά για κοινωνικά είδη που σχετίζεται με την υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα και τον ανταγωνισμό των πόρων. Σε μεμονωμένους μύες, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνωστισμός μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγική λειτουργία (152). Η στέγαση σε ομάδες χρησιμοποιείται συχνά ως βασικό συστατικό του περιβαλλοντικού εμπλουτισμού (153). Ο κοινωνικός συνωστισμός έχει αποδειχθεί ότι έχει αντίκτυπο σε πολλές διεργασίες της φυσιολογίας των αρσενικών επίμυων, όπως μεταβολλές στα βάρη οργάνων, έκκριση ορμονών, αντιδραστικότητα άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA), ευαισθησία πόνου και επιδράσεις στην καρδιακή λειτουργία (154,155,156). Φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές

διαφορές φύλου στις συνέπειες του συνωστισμού, με μια μελέτη σε επίμυες να διαπιστώνεται ότι ο συνωστισμός είναι στρεσογόνος παράγοντας για τα αρσενικά αλλά έχει την ικανότητα να ηρεμεί τα θηλυκά (157).

1.4.2 Ορισμός της Επιθετικής Συμπεριφοράς

Η επιθετικότητα περιλαμβάνει μια σειρά από διαφορετικά πρότυπα συμπεριφοράς και είναι πολυδιάστατη ως προς την προέλευση, τα κίνητρα, τις εκφράσεις και τις λειτουργίες (158). Οι ορισμοί της επιθετικότητας αναφέρονται σε διαφορετικούς υποτύπους επιθετικότητας ή ορίζονται γενικά ως «συμπεριφορά που προκαλεί βλάβη και τραυματισμό ή απειλεί να το κάνει» (159) ή «οποιαδήποτε μορφή συμπεριφοράς που στρέφεται προς το στόχο της βλάβης ή τραυματισμού ενός άλλου ζωντανού όντος" (160). Από ηθολογικής πλευράς, οι επιθετικές ή αγωνιστικές συμπεριφορές είναι "προσαρμογές" για καταστάσεις που αφορούν φυσικές συγκρούσεις ή διαμαρτυρίες μεταξύ μελών του ίδιου είδους" (161). Έτσι, η έρευνα σχετικά με την επιθετικότητα και με τη χρήση ζωικών μοντέλων τείνει να διερευνά την ηθολογική σημασία της συμπεριφοράς, όπως η λειτουργικότητά της επιθετικότητας στην επιβίωση, την αναπαραγωγή, τη φυλογενετική και την οντογενετική ανάπτυξή του ζώου. Μια τέτοια επιθετική συμπεριφορά είναι επωφελής για το ζώο, επειδή αυτή η συμπεριφορά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση τροφής, νερού και άλλων πόρων, συμπεριλαμβανομένων των θηλυκών συντρόφων στην περίπτωση των αρσενικών, και για την υπεράσπιση των απογόνων της επικράτειάς του ή της κοινωνικής του θέσης. Η επιθετική συμπεριφορά συνεπάγεται τους σχετικούς κινδύνους τραυματισμού ή ακόμη και τον θάνατο, καθώς και τις υψηλές δαπάνες για την ενέργεια (162,163). Όταν η ισορροπία διαταραχθεί και το ζώο παρουσιάζει υπερβολικό επίπεδο επιθετικότητας, η συμπεριφορά δεν είναι πλέον προσαρμοστική και θα μπορούσε να ονομαστεί κακή προσαρμογή ή παθολογική επιθετικότητα.

Στα τρωκτικά, η επιθετική συμπεριφορά εκδηλώνεται κυνηγώντας, με αμυντικές όρθιες στάσεις και δαγκώματα επίθεσης (164). Η επίθεση συνήθως κατευθύνεται προς λιγότερο ευάλωτες περιοχές του σώματος όπως η πλάτη και οι πλευρές του αντιπάλου (165). Η επιθετικότητα που παρουσιάζεται ως απάντηση σε απειλητικά ή προκαλούμενα από φόβο ερεθίσματα, συχνά συνοδεύεται από διαφυγή (166). Στα περισσότερα εργαστηριακά τρωκτικά, η επιθετική συμπεριφορά περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα αρσενικά. Τα

θηλυκά σε πολλά είδη τρωκτικών δείχνουν έντονη επιθετική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων περιόδων μετά τον τοκετό, που αναφέρονται ως επιθετικότητα της μητέρας, προστατεύοντας τους νεογέννητους απογόνους τους από αρσενικούς εισβολείς (167). Στα περισσότερα τρωκτικά, η επιθετική συμπεριφορά των θηλυκών εκδηλώνεται πριν την κύηση, φτάνει στο ανώτατο σημείο τη πρώτη εβδομάδα μετά τον τοκετό και μειώνεται στη συνέχεια (168,169).

Στα αρσενικά, τα σημάδια επιθετικότητας περιλαμβάνουν τον εκφοβισμό του αντιπάλου και σε περίπτωση επίθεσης στα λιγότερο ευάλωτα τμήματα του σώματος του αντιπάλου, όπως αυτά που καλύπτονται από μυς και ένα παχύ στρώμα δέρματος, στοχεύοντας στην αποφυγή σοβαρών τραυματισμών (170,171). Ενώ η μη φυσιολογική επιθετικότητα συνήθως εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια αγώνα για επικράτηση ή ζευγαρώμα, η αμυντική επιθετικότητα εμφανίζεται κυρίως σε απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις και συνδέεται με αυξημένο φόβο (172). Σε αντίθεση με την μη φυσιολογική επιθετικότητα, η επιθετικότητα άμυνας είναι μικρότερης έντασης και οι στόχοι επίθεσης περιλαμβάνουν πιο ευάλωτα τμήματα του σώματος (όπως το κεφάλι, την κοιλιά και τα γεννητικά όργανα) (170,171).

Αν και η μη φυσιολογική επιθετικότητα είναι προσαρμοστική και απαραίτητη για την αναπαραγωγική επιτυχία, μπορεί να καταστεί επιβλαβής και να μετατραπεί σε ανώμαλες μορφές επιθετικότητας όταν ένα ζώο (i) αγνοεί ειδικούς κανόνες για τα είδη, (ii) δεν καταλαβαίνει τα κοινωνικά σήματα του αντιπάλου (π.χ. συνεχίζει να επιτίθεται) ή (iii) επιτίθεται έντονα όταν προκαλείται (173). Παρόλο που σπάνια παρατηρούνται ασυνήθιστες μορφές επιθετικότητας σε ζώα που ζουν στο φυσικό τους περιβάλλον, διάφοροι παράγοντες μπορεί να αυξήσουν την εμφάνιση υπερβολικών μορφών επιθετικότητας, όπως η στέγαση υπό αγχωτικές συνθήκες, η οξεία έκθεση στο στρες και οι γενετικοί παράγοντες.

1.4.2.1 Η νευροβιολογία της επιθετικής συμπεριφοράς στα τρωκτικά

Προκειμένου να κατανοήθει η νευρολογία της επιθετικής συμπεριφοράς, έχει αναλυθεί το άμεσο πρώιμο γονίδιο για να εντοπιστούν περιοχές του εγκεφάλου που ενεργοποιούνται από επιθετικές πράξεις. Η ανάλυση της έκφρασης του c-Fos (το c-Fos είναι πρωτεϊνικό προϊόν ενός άμεσου πρώιμου γονιδίου (immediate early gene IEG), fos, το οποίο εκφράζεται σε νευρώνες αμέσως μετά την ενεργοποίηση τους και στη συνέχεια επάγει την έκφραση των γονιδίων) έχει εντοπίσει αρκετές περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται

στην επιθετικότητα μεταξύ των αρσενικών, στη μητρική επιθετικότητα και στην κλιμάκωση της επιθετικότητας. Υπάρχουν μεγάλες αλληλεπικαλύψεις μεταξύ των περιοχών του εγκεφάλου που εμπλέκονται σε διαφορετικούς τύπους επιθετικότητας, αλλά και κάποια διαφοροποίηση ανάλογα με τον τύπο της επιθετικότητας (174).

I. Υποθάλαμος και επιθετικότητα

Έχει δειχθεί πως οι διαταραχές του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) σχετίζονται με το στρες στον άνθρωπο (175,176) και την επιθετική συμπεριφορά (177,178). Η υψηλή δραστηριότητα του άξονα HPA έχει σαν αποτέλεσμα ξαφνικές εκρήξεις επιθετικότητας, ενώ η χρόνια χαμηλή δραστηριότητα HPA άξονα, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες αλλαγές στις λειτουργίες του εγκεφάλου που προωθούν τη βία (179). Έτσι, η ελαττωματική ρύθμιση των ορμονών HPA μπορεί να συμβάλλουν στην βίαιη συμπεριφορά υπό συνθήκες στρες (180). Οι ακριβείς μηχανισμοί αυτών των διαφορετικών μορφών επιθετικότητας δεν έχουν γίνει ακόμα κατανοητοί. Η ρύθμιση της επιθετικότητας απαιτεί πολύπλοκο κύκλωμα της διασύνδεσης νευρωνικών δομών στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, αμυγδαλή, υποθάλαμος, ιππόκαμπος και οι περιοχές του φλοιού έχουν εμπλακεί στην ανδρική επιθετικότητα, καθώς κάθε μία από αυτές τις περιοχές έχει ιεραρχικό ρόλο στον έλεγχο της επιθετικότητας. Η επίθεση και η βία μπορεί να προκύψουν ως συνέπεια της ελαττωματικής ρύθμισης συναισθημάτων (181). Πράγματι, οι ασθενείς με ορισμένους τύπους εγκεφαλικών βλαβών παρουσιάζουν υψηλή βία και επιθετικότητα (182,183,184). Στην έρευνα των ζώων, η νευροβιολογία της επιθετικότητας και άλλων στρεσογόνων αντιδράσεων μετράται γενικά από την πρωτεϊνική έκφραση του άμεσου πρώιμου γονιδίου c-fos (185,186). Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του υποθαλάμου (περιοχή υποθαλαμικής προσβολής, hypothalamic attack area HAA) προκαλεί παθολογική επιθετική συμπεριφορά στα τρωκτικά (187,188). Η αργινίνη-βασοπρεσίνη (arginine vasopressin AVP), που απελευθερώνεται μέσα σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές (189,190,191) ρυθμίζει τη δραστηριότητα του υποθαλάμου και ενισχύει τις επιθετικές συμπεριφορές στα αρσενικά τρωκτικά (192).

II. Προμετωπιαίος φλοιός και επιθετικότητα

Ο προμετωπιαίος φλοιός (prefrontal cortex PFC), ειδικά ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός (medial prefrontal cortex mPFC) και ο κογχομετωπιαίος φλοιός (orbitofrontal cortex OFC),

έχουν ανασταλτικό αποτέλεσμα στην επιθετικότητα (193). Οι υποδοχείς σεροτονίνης (5-hydroxytryptamine 5-HT) φαίνεται να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του PFC, αλλά ο ρόλος του στην επιθετικότητα εξαρτάται από 1. τους υποδοχείς και την περιοχή του εγκεφάλου που αυτοί εκφράζονται και 2. τους τύπους των επιθετικών συμπεριφορών έναντι κλιμακούμενης επιθετικότητας (194).

III. Οσφρητικό σύστημα και επιθετικότητα

Οι πληροφορίες για τις φερομόνες που επεξεργάζεται ο οσφρητικός βολβός είναι απαραίτητες για την κατάλληλη κοινωνική συμπεριφορά στα τρωκτικά, συμπεριλαμβανομένων των επιθετικών και των σεξουαλικών συμπεριφορών (195). Η διακοπή της ενεργοποίησης του βορειομοριακού οργάνου (vomeronasal organ VNO) προκαλεί τα αρσενικά να αποφύγουν την επιθετική συμπεριφορά (196).

IV. GABA και επιθετικότητα

Το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (gamma-aminobutyric acid GABA) έχει σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση της επιθετικής συμπεριφοράς στο τυπικό (προσαρμοστικό) είδος. Φαρμακολογικές και γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι σχεδόν όλοι οι υποτύποι γλουταμικού (NMDA, AMPA, υποδοχείς καϊνικού και mGluRs) και GABA (GABA A και GABA B) υποδοχείς εμπλέκονται στην επιθετικότητα (197,198,199). Ωστόσο, ο ρόλος καθενός από τους υποδοχείς μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη σύνθεση των υπομονάδων υποδοχέα, τον εντοπισμό του και τον τύπο της επιθετικής συμπεριφοράς που μελετάται (200).

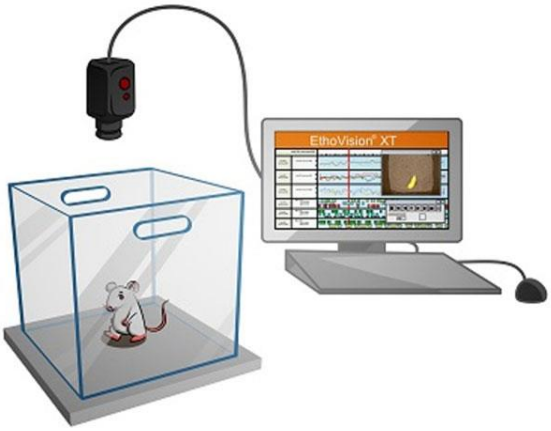
1.4.3 Συμπεριφορά που σχετίζεται με το άγχος

Το άγχος μπορεί να ερμηνευθεί ως μια συναισθηματική πρόβλεψη μιας αποτρεπτικής κατάστασης και αντανακλάται από τις συγκεκριμένες για το είδος συμπεριφορικές αντιδράσεις φόβου σε αγχωτικά και απειλητικά ερεθίσματα. Ο φόβος θεωρείται ως μια σύνθετη συμπεριφορική απόκριση, όπως η έκπληξη ή η κατάπληξη. Περαιτέρω, εκτός από

τους παράγοντες που καθορίζουν το έμφυτο (χαρακτηριστικό) άγχος, αρκετοί περιβαλλοντικοί ή φαρμακολογικοί παράγοντες μπορεί να αλληλοεπιδράσουν με το γενετικό υπόβαθρο και να προσδιορίσουν το ατομικό επίπεδο του κοινωνικού άγχους και του τελικού φαινότυπου συμπεριφοράς.

Παρόλο που τα επαρκή επίπεδα άγχους και οι επακόλουθες αντιδράσεις φόβου είναι επωφελείς για ένα άτομο, οι υπερβολικές και ανεξέλεγκτες μορφές άγχους και φόβου είναι ακατάλληλες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Μια ποικιλία μοντέλων τρωκτικών έχει δημιουργηθεί για να αποκαλύψει τη σύνθετη νευροβιολογία του εγκεφάλου και τους νευρωνικούς και γενετικούς μηχανισμούς που διέπουν τις φυσιολογικές και ακραίες μορφές του κοινωνικού άγχους (201,202). Τέτοια μοντέλα τρωκτικών περιλαμβάνουν εκλεκτική αναπαραγωγή επίμυων ή μυών (203,204), έκθεση στο στρες πρίν απογαλακτιστούν (205), ή σε χρόνιο στρες στην ενήλικη ζωή (206,207,208). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συμπεριφοράς που σχετίζεται με το άγχος στα τρωκτικά, αρκετές εργαστηριακές εξετάσεις έχουν επικυρωθεί επιτυχώς (209). Ο υπερυψωμένος λαβύρινθος (EPM) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μη κλινική δοκιμή για το άγχος που βασίζεται στη σύγκρουση μεταξύ της εξερευνητικής κίνησης του αρουραίου και του έμφυτου φόβου στους φωτεινούς και ανοιχτούς χώρους (210). Ένα υψηλό επίπεδο άγχους εκφράζεται με την αποφυγή αυτών των αποσπασματικών ζωνών, δηλαδή των ανοιχτών, φωτεινών ή μη προστατευμένων βραχιόνων της συσκευής δοκιμών, τα οποία μπορούν να επικυρωθούν με καθιερωμένες αγχολυτικές και αγχογόνες ουσίες (211).

Η δοκιμή ανοικτού πεδίου (OFT) χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των συμπεριφορών των επίμυων. Αυτή η δοκιμή εκμεταλλεύεται την φυσική τάση των επίμυων να προτιμούν να εξερευνήσουν την περιφέρεια νέου περιβάλλοντος. Το OFT μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του άγχους με την ποσοτικοποίηση του χρόνου που αφιερώνεται στην εσωτερική αρένα ή στην εξωτερική αρένα (περιφέρεια). Πρόκειται για ένα από τα πιο συνηθισμένα τεστ συμπεριφοράς που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των επιδράσεων του εμπλουτισμού περιβάλλοντος στην κινητική δραστηριότητα και την προσαρμογή στους επίμυες (εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Απεικονίζεται η συσκευή για τη δοκιμή ανοικτού πεδίου.
Πηγή: https://www.noldus.com/blog/ethovision-xt-and-open-field-test

1.4.3.1 Σχέση μεταξύ επιθετικότητας και άγχους

Τα ευρήματα τόσο από τις προκλινικές όσο και από τις κλινικές μελέτες σχετικά με τη σχέση μεταξύ άγχους και επιθετικότητας είναι αντιφατικά, καθώς τα αγχολυτικά φάρμακα, για παράδειγμα, μπορούν να μειώσουν ή να ενισχύσουν την επιθετική συμπεριφορά των αρσενικών σε διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένων των τρωκτικών (212,213,214). Εκτός από τις αγχολυτικές, ηρεμιστικές και κατασταλτικές επιδράσεις τους, οι βενζοδιαζεπίνες γενικά μειώνουν την επιθετική συμπεριφορά στους ανθρώπους, αν και μπορούν να προκαλέσουν επιθετικότητα σε ορισμένους ασθενείς που υποφέρουν από διαταραχές πανικού ή συμπεριφοράς (215,216). Τα άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των διαταραχών που σχετίζονται με την επιθετικότητα ασκούν τα αποτελέσματά τους μέσω των ντοπαμινεργικών ή σεροτονεργικών συστημάτων, τα οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το άγχος (217,218). Έτσι, αν και η ρύθμιση της επιθετικότητας και του άγχους είναι πιθανόν βασισμένη στην εμπλοκή επικαλυπτόμενων οδών εγκεφάλου, η σύνθετη αλληλεπίδρασή τους απέχει πολύ από το να είναι σαφής λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας σχετικών ζωικών μοντέλων που συνδυάζουν την επιθετικότητα και το άγχος.

1.4.4 Σκοπός εργασίας

Η έκθεση σε εμπλουτισμένο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την συμπεριφορά των ζώων εργαστηρίου. Συχνά, τα μοντέλα που χρησιμοποιούν τροχούς χρησιμοποιούν έναν μόνο επίμυ και τροχό ανά κλωβό, ο οποίος αποκλείει τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα δραστηριότητας και άλλες παραμέτρους λόγω άγχους καθώς η απομόνωση μπορεί να προκαλέσει άγχος, η οποία μπορεί να εκφραστεί με μεταβολές στη φυσιολογία τους (ορμόνες απόκρισης, καρδιακό ρυθμό και αρτηριακή πίεση) ανήσυχη και πανικόβλητη συμπεριφορά. Από την άλλη πλευρά, ο εμπλουτισμός δεν θα πρέπει να δημιουργεί εντάσεις μεταξύ των συστεγαζόμενων ζώων ούτε να αναπτύσσεται ανταγωνιστική και επιθετική διάθεση, διότι τότε αυτή η κατάσταση φέρει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό που επιδιώκεται. Αυτή η μελέτη σχεδιάστηκε για να εκτιμήσει την επίδραση του εμπλουτισμού στη συμπεριφορά αρσενικών επιμύων, τα αποτελέσματα της πυκνότητας στέγασης και της διαθεσιμότητας των τροχών σε επίπεδα δραστηριότητας σε επίμυες αμέσως μετά των απογαλακτισμό τους. Αν και ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος διαβίωσης των ζώων με διάφορα αντικείμενα έχει μελετηθεί εκτενώς η μη επαρκής πρόσβαση των ζώων σε αυτά δεν έχει μελετηθεί ικανοποιητικά.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Περιγραφή εγκαταστάσεων

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου, Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Η εγκατάσταση λειτουργεί σύμφωνα με τις διατάξεις του Προεδρικού Διατάγματος 56/2013 σε εναρμόνιση προς την Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 (L 276/33/20.10.2010) περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς και είναι εγκεκριμένη από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Νομαρχίας Αθηνών.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 16 αρσενικοί επίμυες, στέλεχος RccHan, ηλικίας 23 ημερών. Επιλέχτηκε το στέλεχος RccHan, διότι χρησιμοποιούνται ευρύτατα στα ερευνητικά πρωτόκολλα. Επιπλέον, επιλέχτηκαν αρσενικοί μύες και όχι θηλυκοί για να μην υπάρχει μεταβολή της συμπεριφοράς τους, η οποία εκδηλώνεται ανάλογα με τη φάση του οιστρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Για να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα με θηλυκά θα έπρεπε όλοι οι μύες να βρίσκονταν στο ίδιο στάδιο οιστρικού κύκλου.

Τα ζώα στεγάζονταν ανά 4 σε ειδικούς κλωβούς, χρησιμοποιήθηκε ανοιχτού τύπου κλωβός (open cage). Οι συνθήκες στέγασης στο θάλαμο διαβίωσης των ζώων ήταν: θερμοκρασία δωματίου 25 ±1°C, σχετική υγρασία 55 ±10% και πίεση 0,6 Pa, ως προς τον διάδρομο κυκλοφορίας. Η μέτρηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας (δωματίου και στο εσωτερικό του κλωβού) γινόταν με θερμόμετρο - υγρασιόμετρο.

Η εναλλαγή φωτός / σκότους στο θάλαμο ήταν δωδεκάωρη (12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) με τα φώτα να ανοίγουν στις 7 π.μ., να κλείνουν στις 7 μ.μ. Ο φωτισμός στο θάλαμο στέγασης γινόταν με λαμπτήρες φθορισμού σωληνωτού σχήματος (tubular) οι οποίοι χρησιμοποιούσαν ψυχρό φωτισμό (cool lighting). Κάθε κλωβός περιείχε στρωμνή, τροφή και νερό σε επαρκή ποσότητα όπως και στα υπόλοιπα ζώα της μονάδας. Η στρωμνή που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου corncob (Rehofix MK 2000, J. Rettenmaier & Rosenberg, Germany), η αλλαγή της οποίας γινόταν μία φορά την εβδομάδα μαζί με τον καθαρισμό των κλωβών. Χρησιμοποιήθηκε τροφή με μορφή σύμπηκτων (pellets), ακτινοβολημένη και συσκευασμένη σε κενό αέρα (Mucedola, Diet Standard, 4RF22, Italy) και νερό μέσα σε ειδικά μπουκάλια. Τροφή και νερό παρέχονταν σε επαρκή ποσότητα ώστε να

καταναλώνονται από τα ζώα κατά βούληση (ad libitum). Οι συνθήκες στέγασης ελέγχονταν καθημερινά από εξειδικευμένο προσωπικό, ώστε να εξασφαλίζεται η ευζωία των ζώων. Για την ταυτοποίηση των ζώων επιλέχθηκε προσωρινή μέθοδος σήμανσης, το μαρκάρισμα με ειδική αρίθμηση στις ουρές των επιμύων.

2.2 Όργανα-Συσκευές-Υλικά

Σε αυτό το σημείο περιγράφονται όλα τα όργανα, οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας εργασίας, ώστε να κατανοηθούν περισσότερο τα κομμάτια των πειραματικών διαδικασιών και της καταγραφής των δεδομένων που θα αναλυθούν παρακάτω.

- Κλωβός επιμύων: Ειδική κατασκευή από plexiglass με ύψος 30 cm, πλάτος 40 cm και μήκος 48 cm (εικόνα 8).
- Τροχός επίμυων, διαμέτρου 33 cm και πλάτους λωρίδας 10 cm (εικόνα 8).
- Μετρητής στροφών των τροχών άσκησης Hengstler Tico 731 (εικόνα 9). Αρχή της λειτουργίας: στερεώνεται σταθερά στον τροχό κίνησης στην εξωτερική επιφάνεια (η οποία δεν είναι προσβάσιμη στους επίμυες). Η απομακρυσμένη μονάδα μέτρησης καταγράφει τον αριθμό περιστροφών.
- Ζυγαριά (DELMAC instruments DSW200D) (εικόνα 10).
- Υπολογιστής.
- Στρωμνή τύπου corncob (Rehofix MK 2000, J. Rettenmaier & Rosenberg, Germany) (εικόνα 8).
- Τροφή με μορφή σύμπηκτων (pellets), ακτινοβολημένη και συσκευασμένη σε κενό αέρα (Mucedola, Diet Standard, 4RF22, Italy) (εικόνα 11).

Εικόνα 8 : Κλωβός, τροχός, στρωμνή τύπου corncob κσι 4 επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου, Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας.

Εικόνα 9 : Μετρητής στροφών των τροχών άσκησης Hengstler Tico 731, Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου, Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας.

Εικόνα 10 : Ζυγαριά (DELMAC instruments DSW200D), Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου, Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας.

Εικόνα 11 : Τροφή που χρησιμοποιήθηκε, Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Κέντρου, Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας.

2.2.1 Πρόγραμμα Noldus Ethovision XT

Το πρόγραμμα Noldus Ethovision XT είναι ένα λογισμικό γενικής χρήσης για την καταγραφή συμβάντων και την ανάλυση των δεδομένων στην συμπεριφορική έρευνα. Επιτρέπει στους προσωπικούς υπολογιστές να χρησιμοποιηθούν ως καταγραφείς συμβάντων. Επιπλέον, το πρόγραμμα παρέχει την επιλογή να διεξαχθεί το πείραμα σε συγκεκριμένες προδιαγραφές ή να χρησιμοποιήθει ένα από τα προκαθορισμένα πρότυπα για την καταγραφή συμβάντων. Η διαμόρφωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε άμεσα για την

καταγραφή συμβάντων στον προσωπικό υπολογιστή ή να μεταφερθεί σε μια γεννήτρια προγραμμάτων που δημιουργεί ένα πρόγραμμα για τη συλλογή δεδομένων από έναν υπολογιστή χειρός. Τα δεδομένα της παρατήρησης από κάθε ένα από αυτά τα είδη υπολογιστών μπορούν να αναλυθούν από το πρόγραμμα. Οι ρυθμίσεις της καταγραφής γεγονότων μπορούν να προσαρμοστούν σε πολλά διαφορετικά πειραματικά σχέδια. Διάφορα λέξεις κλειδιά μπορούν να οριστούν ως γεγονότα και τροποποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δείξουν τα όρια ενός γεγονότος. Το πρόγραμμα επιτρέπει την ομαδοποίηση των γεγονότων σε διάφορες τάξεις και την διάκριση μεταξύ κοινών αποκλειστικών γεγονότων και μη αποκλειστικών, όπως επίσης και μεταξύ γεγονότων διαρκείας και γεγονότων συχνότητας. Το χρονοδιάγραμμα των γεγονότων είναι ακριβές κατά 0,1 δευτερόλεπτα. Υπάρχει επίσης και ένα online σημειωματάριο που επιτρέπει την καταγραφή σημειώσεων που πρέπει να γίνουν κατά την διάρκεια μιας παρατήρησης. Το πρόγραμμα επίσης περιλαμβάνει και online διόρθωση σφαλμάτων. Επιπλέον μπορούν να καταγραφούν σχόλια χρηστών καθώς και να αποθηκευθούν ανεξάρτητες μεταβλητές μαζί με τα δεδομένα της παρατήρησης. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δεδομένων, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει το επίπεδο της ανάλυσης και τον τύπο του αρχείου εξόδου. Μπορεί, επίσης να υπολογιστεί η συχνότητα εμφάνισης και η διάρκεια για διάφορες κατηγορίες γεγονότων, για μεμονωμένα γεγονότα ή συνδυασμούς τους. Για την ανάλυση της εμφάνισής τους, μπορεί να επιλεχθεί ο αριθμός των επιπέδων ενσωμάτωσης και η σειρά τους. Το αρχείο εξόδου μπορεί να είναι σε αρχεία ακολουθίας (ofsorted event sequence files), σε αρχεία κειμένου (text report files) και σε αρχεία πινάκων ASCII (tabular ASCII files). Τα αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν σε υπολογιστικά φύλλα (spreadsheets) και σε στατιστικά προγράμματα.

2.3 Σκοπός των Test

Εκτίμηση της επίδρασης του εμπλουτισμού περιβάλλοντος (τροχός) στη συμπεριφορά αρσενικών επίμυων με συγκεκριμένα τεστς, τα οποία θα διεξαχθούν αφού παραμείνουν στο κλωβό ένα μήνα από την ηλικία του απογαλακτισμού τους (23 ημερών).

2.3.1 ΥΛΙΚΑ

1. 16 επίμυες στελέχους RccHan ηλικίας 23 ημερών
2. συσκευή ανοιχτού εξερευνητικού πεδίου (Openfield)
3. συσκευή υπερυψωμένου λαβύρινθου (Elevated Plus Maze)
4. συσκευή κοινωνικότητας και προτίμησης για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty)
5. συσκευή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας (Social dominance tube test)
6. Τροφή
7. Νερό
8. 2 κάμερες βιντεοσκόπησης (IP και Απλή κάμερα βιντεοσκόπησης)
9. Ζυγαριά
10. Υπολογιστής με πρόγραμμα επεξεργασίας Noldus Ethovision XT

2.4 Πειραματική διαδικασία

Επιλέγουμε 16 επίμυες ηλικίας 23 ημερών από την ίδια τοκετοομάδα, τους οποίους χωρίζουμε σε τέσσερις ομάδες των τεσσάρων ζώων έκαστη. Στους κλωβούς των τριών ομάδων (A, B, C) τοποθετείται ένας τροχός με το μετρητή στροφών για την καταμέτρηση τους. Ο κλωβός της τέταρτης ομάδας, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί ως control του πειράματος, δεν τοποθετείται τροχός. Τις δύο πρώτες βδομάδες της παρατήρησης γίνεται καταγραφή των κινήσεων των ζώων με βιντεοκάμερα προκειμένου να παρατηρηθεί η συμπεριφορά τους αναφορικά με τη χρήση του τροχού. Μετά την ολοκλήρωση ενός μήνα, τα ζώα θα περάσουν από τέσσερα διαφορετικά συμπεριφορικά τεστ που περιγράφονται παρακάτω.

2.4.1 Πρωτόκολλο δοκιμασίας ανοιχτού εξερευνητικού πεδίου (Openfield)

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, είναι ένα τεστ το οποίο αξιολογεί την αγχώδη συμπεριφορά των τρωκτικών, την εξερευνητική δραστηριότητα, καθώς και την κινητικότητα (ποια διαδρομή ακολουθείται, μήκος της διαδρομής που διανύθηκε και χώρος που κινήθηκε το ζώο περισσότερο, κεντρικά ή περιφερικά του κουτιού). Για τη

συγκεκριμένη δοκιμασία, έγινε χρήση ενός ακρυλικού κουτιού, με διαφανή τοιχώματα, διαστάσεων 40cmx40cmx40cm. Σε αυτό το κουτί, αφέθηκε κάθε ζώο ελεύθερο για να εξερευνήσει τον χώρο. Η διαδικασία κράτησε 60 λεπτά. Μέτα το πέρας έκαστου πειραματισμού, το ακρυλικό κουτί καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 70% για την απομάκρυνση της οσμής του προηγούμενου ζώου. Για την αξιολόγηση, μετρήθηκε η συνολική απόσταση που διανύθηκε στην κεντρική περιοχή του κλωβού, μέτρηση που σχετίζεται με τη κινητική δραστηριότητα, ο συνολικός χρόνος (s) και η ταχύτητα (cm/s) του ζώου κατά τη διάρκεια του οποίου, ο επίμυς βρισκόταν στην κεντρική περιοχή του κλωβού, ως δείκτη αγχώδους συμπεριφοράς (219). Οι μετρήσεις, αφού βιντεοσκοπήθηκαν αναλύθηκαν μετέπειτα με τη χρήση του Noldus Ethovision XT.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2 ζώα/ trial

Διάρκεια τεστ: 60 min

ΥΛΙΚΑ

2 κουτιά από Plexiglass 40cm x40 cm x40 cm

χαρτόνι κολλημένο στο πάτωμα για την οριοθέτηση των κουτιών

λευκό χαρτόνι για τον διαχωρισμό των κουτιών

camera για καταγραφή

1) Τοποθετούμε το ένα κουτί Plexiglass πάνω στα χαρτιά με βάση τα όρια που έχουν σχεδιαστεί.

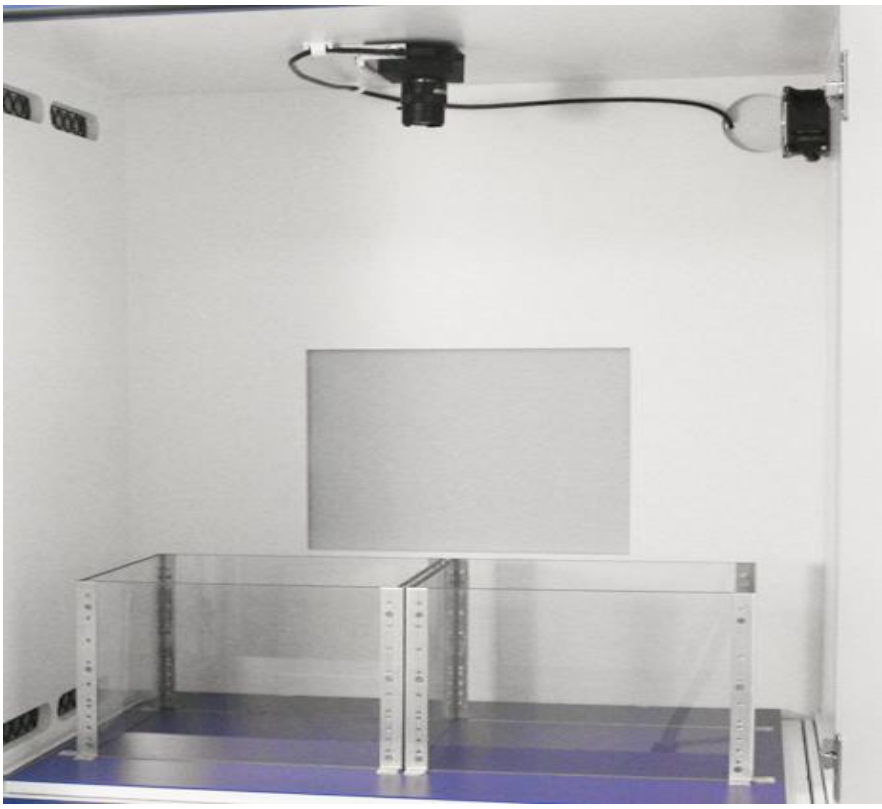
2) Τοποθετούμε το άλλο κουτί ακριβώς δίπλα από το προηγούμενο. Μεταξύ των δύο κουτιών τοποθετούμε λευκό χαρτόνι ως διαχωριστικό.

3) Βεβαιωνόμαστε ότι έχουμε σε λειτουργία το σωστό τύπο λάμπας.

4) Ανοίγουμε κάμερα και ελέγχουμε ότι η λήψη γίνεται σωστά (αν χρειαστεί βάζουμε μαρκαδόρους στα πλευρικά τοιχώματα για να βλέπουμε τα όρια της αρένας).

5) Βάζουμε κάθε επίμυ στην κεντρική περιοχή του κουτιού με το κεφάλι να κοιτάει προς τον ερευνητή.

6) Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για τους υπόλοιπους επίμυες του group (εικόνα 12).



Εικόνα 12 : Υλικά για την δοκιμασία ανοιχτού εξερευνητικού πεδίου (Openfield). Πηγή:https://www.med-associates.com/product/mouse-open-field-test-package-with-nir-lighting/

2.4.2 Πρωτόκολλο δοκιμασίας υπερυψωμένου λαβύρινθου (Elevated Plus Maze)

Την επόμενη ημέρα διεξήχθη η δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze). Είναι μια δοκιμασία κατά την οποία ο επίμυς έχει τοποθετηθεί σε έναν υπερυψωμένο λαβύρινθο σε σχήμα σταυρού με τον ένα βραχίονα ανοιχτό (χωρίς τοιχώματα) και ένα βραχίονα κλειστό (ο κλειστός βραχίονας βρίσκεται υπό σκιά). Η δοκιμασία αυτή έχει ως σκοπό την παρατήρηση της κινητικότητας-δραστηριότητας του επίμυ και στους δύο βραχίονες καθώς και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζεται η εξερευνητική του τάση. Για το σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε μία υπερυψωμένη 51 cm από το έδαφος κατασκευή από PVC, η οποία περιλαμβάνει τέσσερις βραχίονες πλάτους 10cm και μήκους 50cm ο καθένας σε διάταξη σταυρού. Αυτοί οι δύο βραχίονες, ενώνονται σε σχήμα σταυρού και σχηματίζουν έτσι ένα μικρό κεντρικό

τετράγωνο (εικόνα 13). Η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε και αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού της Ethovision (Ethovision XT8.5). Οι αναλύσεις και οι μετρήσεις περιλάμβαναν την συνολική απόσταση, το χρόνο, την ταχύτητα και τη συχνότητα που διένυσε στο κέντρο. Επίσης, τον αριθμό εισόδων του ζώου στους ανοιχτούς (open arm entries) και κλειστούς βραχίονες (closed arm entries) καθώς και ο χρόνος που δαπανήθηκε στον καθένα από αυτούς, ενώ υπολογίστηκε ο δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς όπως αυτός περιγράφεται από την εξίσωση: (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες- χρόνος στους ανοιχτούς)/ (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες + χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες). Για να θεωρηθεί είσοδος, το ζώο έπρεπε να έχει τοποθετήσει και τα τέσσερα άκρα του εντός του βραχίονα. Να σημειωθεί εδώ πως τα τρωκτικά προτιμούν να περνούν περισσότερο χρόνο στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς. Σε αντίστοιχη μελέτη έχει βρεθεί πως ο χρόνος των ζώων στους ανοιχτούς βραχίονες συνδέεται με αγχώδη συμπεριφορά των ζώων («παγώματα», ακινησία κλπ.) καθώς και με μεγαλύτερη συγκέντρωση κορτικοστερόνης (220). Κατά συνέπεια, όταν ο χρόνος που περνάει στους ανοιχτούς βραχίονες είναι μεγαλύτερος, είναι δείγμα άγχους.

Εικόνα 13 : Συσκευή του υπερυψωμένου λαβύρινθου.
Πηγή: http://centers.njit.edu/cibm3/elevated-plus-maze/

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1 ζώα/ trial

Διάρκεια τεστ: 5 min

ΥΛΙΚΑ

EPM

camera

1) Τοποθετούμε τη διάταξη με βάση τα όρια που έχουν σχεδιαστεί στο χαρτόνι.

2) Τοποθετούμε τον επίμυ στην κεντρική περιοχή της διάταξης με το κεφάλι του να κοιτάει πάντα προς τον ίδιο ανοικτό βραχίονα προς τον ερευνητή.

3) Κατά τη διάρκεια των trials παραμένουμε στο χώρο, σε απομακρυσμένη θέση από τη διάταξη, για να παρέμβουμε σε περίπτωση που υπάρξει πτώση του επίμυος από κάποιον από τους ανοικτούς βραχίονες.

4) Όταν ολοκληρωθεί το trial, σταματάμε την καταγραφή.

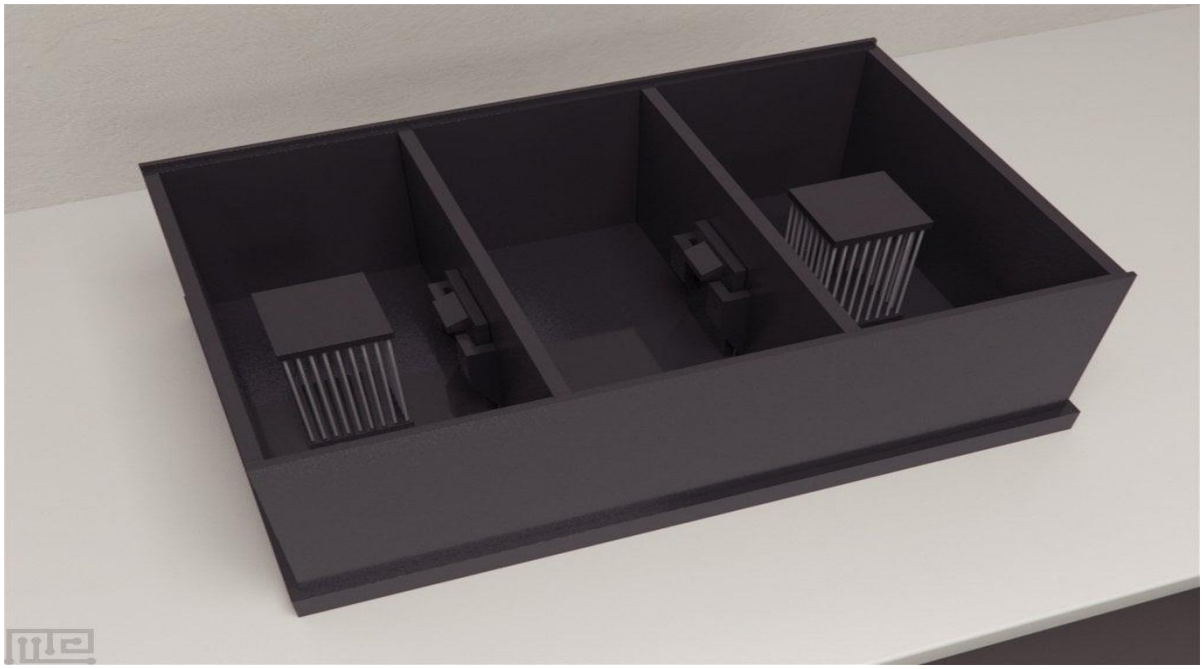
5) Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για τους υπόλοιπους επίμυες του group.

6) Ο καθαρισμός της διάταξης μετά την κάθε χρήση γινόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης.

2.4.3 Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty)

Η επόμενη δοκιμασία ήταν αυτή της κοινωνικότητας και της προτίμησης για νέο κοινωνικό περιβάλλον. Για τη διεξαγωγή της, έγινε χρήση μιας διάταξης, που αποτελούταν από ένα ξύλινο κουτί, το οποίο διαιρούνταν σε τρείς χώρους. Κάθε χώρος (120 cm x 80 cm x 80 cm) επικοινωνούσε με τους γειτονικούς μέσω δύο ανοιγμάτων «πόρτες» (20 cm x 20 cm), τα οποία αρχικά καλύπτονταν από χαρτόνια ανάλογης διάστασης και απομακρύνονταν με την τοποθέτηση του ζώου στο μεσαίο χώρο κατά την έναρξη του τεστ (εικόνα 14). Η δοκιμασία αποτελούνταν από τρία trials, διάρκειας 10 λεπτών το καθένα. Το πρώτο δεκάλεπτο συνιστούσε το trial της εξοικείωσης (habituation) και μελετήθηκαν ο αριθμός των εισόδων στο αριστερό και το δεξί δωμάτιο προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως δεν υπάρχει κάποια προτίμηση για ένα από τα δύο, καθώς και ο χρόνος που δαπανάται στο καθένα από αυτά. Κατά το δεύτερο trial, το ζώο τοποθετήθηκε ξανά στο μεσαίο δωμάτιο, με κλειστές τις «πόρτες», οι οποίες αφαιρέθηκαν με την έναρξη του trial. Πριν την έναρξη, στα δύο πλευρικά δωμάτια, τοποθετήθηκε ένας κυκλικός κλωβός από πλέγμα. Στον έναν κλωβό τοποθετήθηκε ένας RccHan επίμυς, άγνωστος στον πειραματικό επίμυ, καθώς δεν είχαν

αλληλοεπιδράσει ποτέ νωρίτερα, ενώ ο άλλος κλωβός, στο άλλο δωμάτιο, έμεινε κενός. Με την έναρξη του trial, αφαιρέθηκε οι χαρτονένιες πόρτες και ο επίμυς αφέθηκε ελεύθερος για 10 min. Οι μετρήσεις περιλάμβαναν τον αριθμό των εισόδων στο αριστερό και το δεξί δωμάτιο (τα δωμάτια που περιείχαν τους μικρότερους κλωβούς), ο χρόνος που δαπανήθηκε στο καθένα από αυτά. Η τοποθέτηση του αγνώστου ζώου στο αριστερό ή στο δεξί δωμάτιο εναλλασσόταν μεταξύ των σταδίων και των ζώων υπό εξέταση. Στο τρίτο και τελευταίο trial, το ζώο ξεκινάει πάλι τη δοκιμασία από το μεσαίο δωμάτιο. Στον έναν πλευρικό χώρο παραμένει ο κλωβός με τον επίμυ που πριν λίγο είχε αλληλοεπιδράσει, αλλά στον άλλον πλευρικό χώρο ο κλωβός περιέχει έναν νέο, άγνωστο RccHan επίμυ. Και πάλι, με την έναρξη της διαδικασίας, οι πόρτες αφαιρούνται και το ζώο αφήνεται να αλληλοεπιδράσει και να εξερευνήσει για 10min. Για την αξιολόγηση της προτίμησης του ζώου για νέο κοινωνικό περιβάλλον, μετρήθηκε ο χρόνος που δαπανήθηκε σε καθένα από αυτά τα δωμάτια, στον κλωβό με τον επίμυ που γνώρισε νωρίτερα (familiar animal) και τον κλωβό με τον νέο, άγνωστο επίμυ (novel animal). Η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε και αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού της Ethovision (Ethovision XT8.5). Και σε αυτό το στάδιο η τοποθέτηση του νέου και του οικείου ζώου στα δωμάτια, εναλλασσόταν μεταξύ των trials και των πειραματόζωων.



Εικόνα 14 : Συσκευή της κοινωνικότητας και προτίμησης για νέο κοινωνικό περιβάλλον
Πηγή : https://mazeengineers.com/portfolio/sociability-chamber/

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1 ζώο στο πρώτο trial, 2 στο δεύτερο trial, 3 στο τρίτο trial

Διάρκεια τεστ: 10 min

ΥΛΙΚΑ

Sociability κουτί

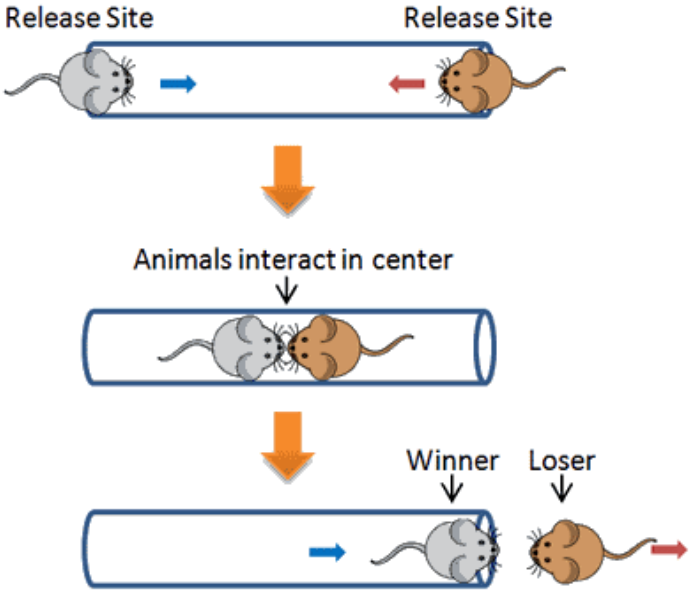
camera

1) Τοποθετούμε τον επίμυ στην κεντρική περιοχή της διάταξης για 10 min.
2) Όταν ολοκληρωθεί το trial, σταματάμε την καταγραφή.
3) Τοποθετούμε τον 'ξένο' επίμυ στο δεξί κυκλικό κλωβό για 10 min.
4) Όταν ολοκληρωθεί το trial, σταματάμε την καταγραφή.
5) Τοποθετούμε τον δεύτερο 'ξένο' επίμυ στο αριστερό κυκλικό κλωβό για 10 min.
6) Όταν ολοκληρωθεί το trial, σταματάμε την καταγραφή.
7) Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για τους υπόλοιπους επίμυες του group.
8) Ο καθαρισμός της διάταξης μετά τη κάθε χρήση γινόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης.

2.4.4 Δοκιμή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας (Social dominance tube test)

Χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας, η οποία είναι ένα αξιόπιστο παράδειγμα για τη μέτρηση της κυριαρχικής συμπεριφοράς στα τρωκτικά (221), αφού παρατηρείται μια αναγκαστική συνάντηση μεταξύ δύο αγνώστων ζώων (222). Η συσκευή είναι ένας διαφανής σωλήνας μήκους 1 m και εσωτερικής διαμέτρου 6 cm, μεγέθους που αρκεί για να επιτρέψει σε έναν ενήλικα επίμυ να διέλθει χωρίς να αναστρέψει την κατεύθυνση (εικόνα 15). Έχει εφαρμοστεί μια διαδικασία εγκλιματισμού για να εξασφαλιστεί ότι οι επίμυες θα κινούνταν εύκολα μέσω του σωλήνα. Δύο ημέρες πριν από τη δοκιμασία, κάθε επίμυς ενθαρρύνθηκε να κινηθεί μέσω του σωλήνα τρεις φορές (έξι συνολικά περάσματα) και στη συνέχεια το ζώο επιστράφηκε στο κλωβό του. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, δύο επίμυες τοποθετήθηκαν σε αντίθετα άκρα του σωλήνα, όπου εισήλθαν ταυτόχρονα στον σωλήνα. Δόθηκε χρονικό περιθώριο έως 5 min για να αναγκάσουν τον άλλο να υποχωρήσει από τον σωλήνα. Εάν ένας επίμυς απομακρυνόταν,

θεωρήθηκε ότι ήταν ηττημένος, ενώ ο άλλος που βρισκόταν στον σωλήνα ήταν ο νικητής και έτσι ταξινομήθηκε υψηλότερα στην κοινωνική ιεραρχία. Εάν μετά από δύο λεπτά κανένας δεν υποχωρούσε, ο αγώνας ήταν ισοπαλία και επαναλαμβανόταν στο τέλος της πειραματικής δοκιμασίας. Μεταξύ κάθε δοκιμής, ο σωλήνας καθαρίστηκε με αιθανόλη 70%. Ο κάθε επίμυς είχε τρείς συνεδρίες με τρείς διαφορετικούς άγνωστους επίμυες. Οι άγνωστοι επίμυες ήταν γεννημένοι την ίδια ημερομηνία με αυτούς του πειράματος. Στην αρχή της δοκιμασίας οι άγνωστοι επίμυες ζυγίστηκαν και σημαδεύτηκαν με μαρκαδόρο στην ούρα.



Εικόνα 15 : Απεικονίζεται η συσκευή του σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας

Πηγή : https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/si.html

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2 ζώα/ trial

Διάρκεια τεστ: 5 min

ΥΛΙΚΑ

Social dominance tube test

Camera

1) Τοποθετούμε τον επίμυ αριστερά του σωλήνα και ταυτόχρονα τον ‘ξένο’ επίμυ δεξιά του σωλήνα, αφήνοντάς τους να συναντηθούν στο κέντρο του σωλήνα.

2) Παρατηρούμε ποιος από τους δύο θα αναγκάσει τον άλλο να υποχωρήσει από τον σωλήνα.

3) Εάν ένας από τους δύο απομακρυνθεί, είναι ηττημένος, ενώ ο άλλος που βρίσκεται στον σωλήνα είναι ο νικητής.

4) Όταν ολοκληρωθεί το trial, σταματάμε την καταγραφή.

5) Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για τους υπόλοιπους επίμυες του group.

6) Ο καθαρισμός του σωλήνα μετά τη κάθε χρήση γινόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης.

2.5 Πρόγραμμα διεξαγωγής δοκιμασιών

Για την ομαλή διεξαγωγή των δοκιμασιών, ακολουθήθηκαν δύο εβδομαδιαία όμοια προγράμματα (**Πίνακας 1**).

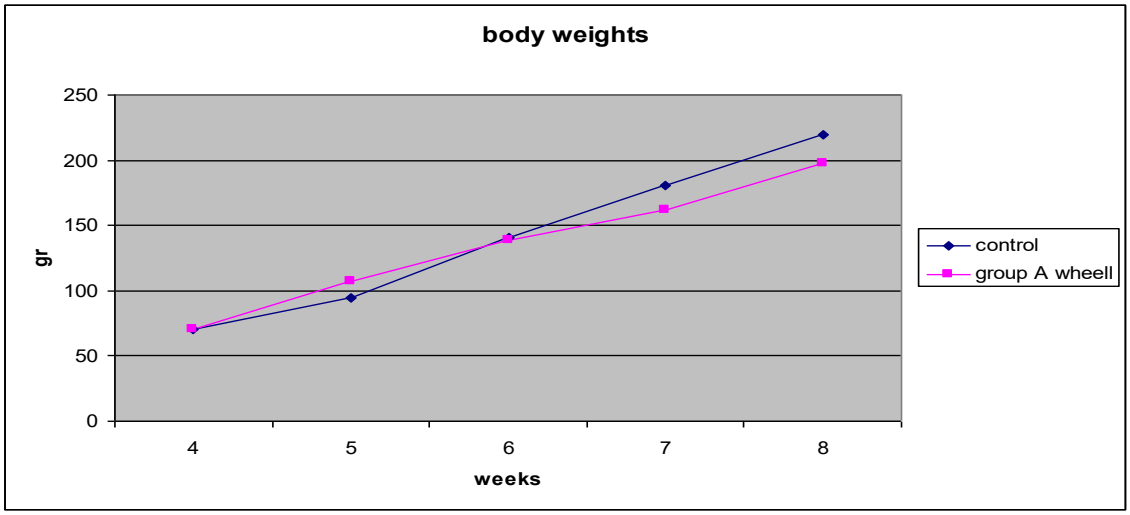
Week 1	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5
Group A	Open Field	Elevated Plus Maze	Sociability	tube	
Group B		Open Field	Elevated Plus Maze	Sociability	tube
Week 2	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**	**Ημέρα 10**
Group C	Open Field	Elevated Plus Maze	Sociability	tube	
Control		Open Field	Elevated Plus Maze	Sociability	tube

Πίνακας 1 : Το πρόγραμμα διεξαγωγής δοκιμασιών.

3 Αποτελέσματα

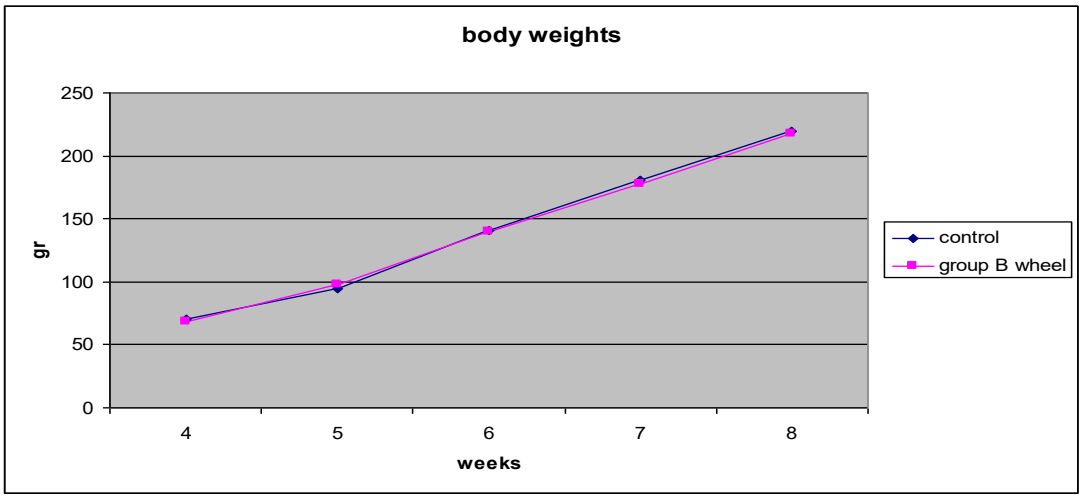
3.1 Σωματικό βάρος: Το βάρος των επίμυων μετρήθηκε εβδομαδιαίως.

Η ομάδα Α εμφανίζει αρχικά αυξημένο σωματικό βάρος, αλλά στη συνέχεια αυξάνει το σωματικό βάρος της ομάδας του control (**Γράφημα 1**).



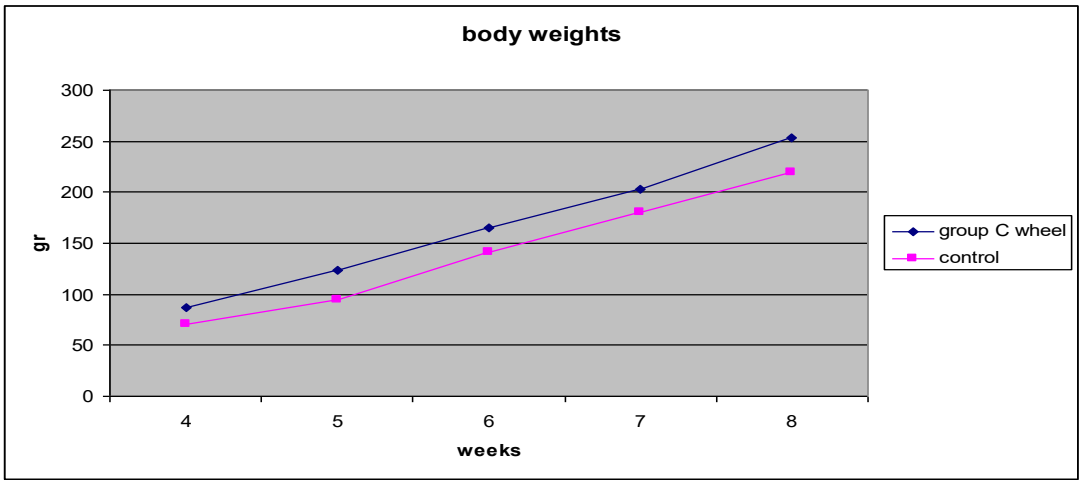
Γράφημα 1: Σωματικό βάρος αρσενικών επιμύων (ομάδας Α και ελέγχου) για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

Η ομάδα Β είναι σύμφωνη με την ομάδα ελέγχου στο σωματικό βάρος (**Γράφημα 2**).



Γράφημα 2: Σωματικό βάρος αρσενικών επιμύων (ομάδας Β και ελέγχου) για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

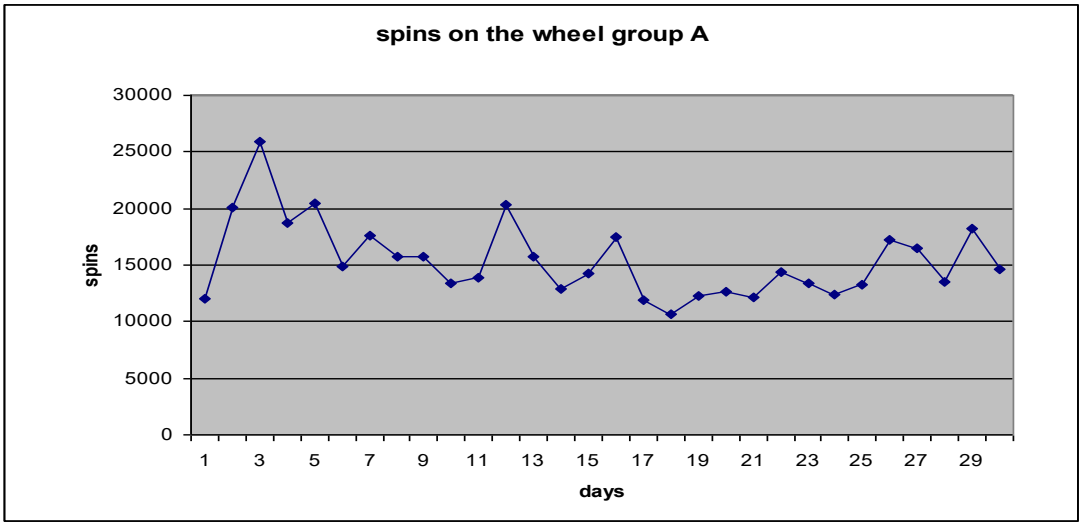
Η ομάδα C παρουσιάζει αυξημένο σωματικό βάρος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 3**).



Γράφημα 3: Σωματικό βάρος αρσενικών επιμύων (ομάδας C και ελέγχου) για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

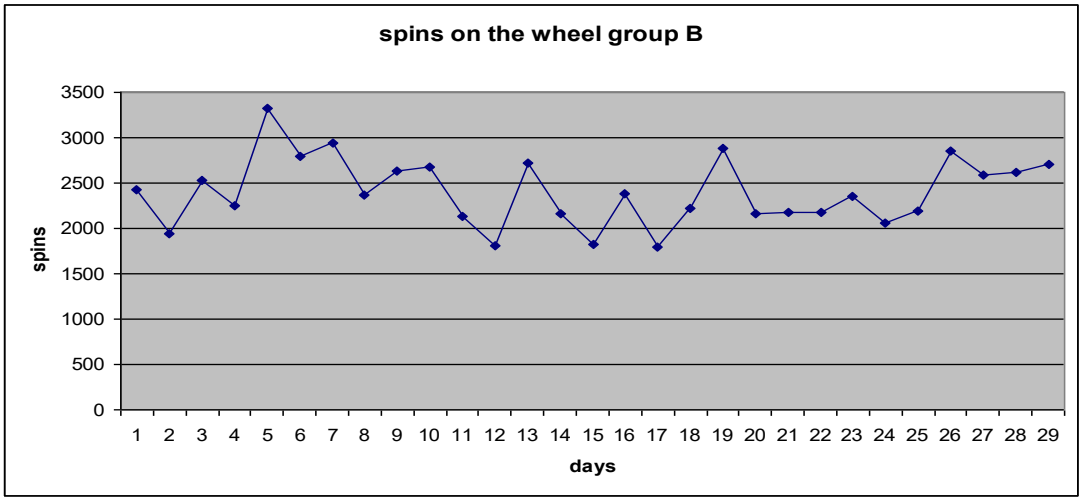
3.2 Ο αριθμός των στροφών στο τροχό μετρήθηκε και στις τρείς ομάδες για διάστημα 30 ημερών.

Στην A ομάδα τις πρώτες μέρες παρατηρήθηκε αύξηση στροφών (25000) και στην συνέχεια ελάττωση αυτών (15000) (**Γράφημα 4**). Ο μέσος όρος των στροφών είναι 15416.



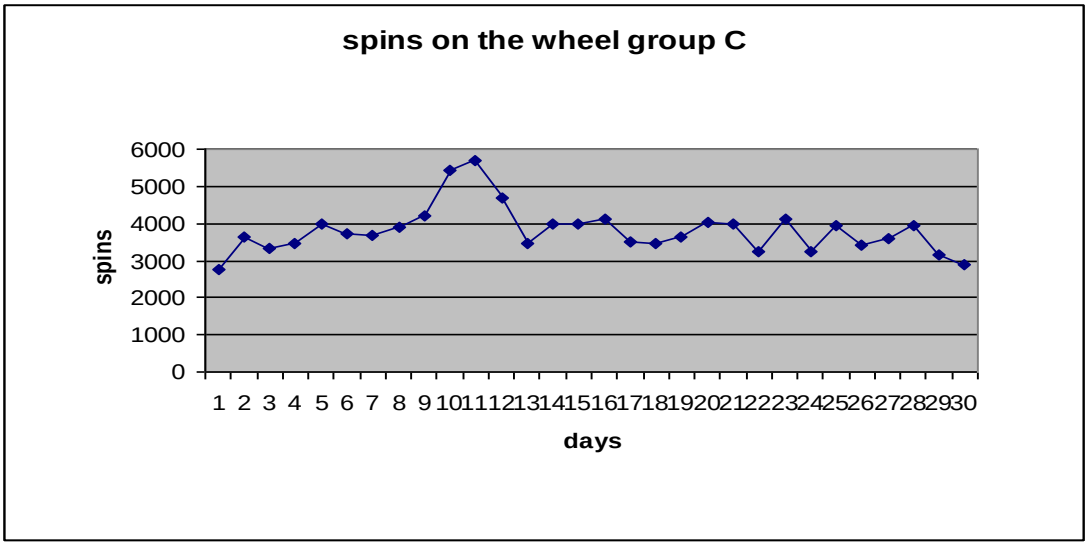
Γράφημα 4: Αριθμός στροφών ομάδας A για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

Στην Β ομάδα τις πρώτες μέρες καταγράφηκε αύξηση στροφών (3400) και ακολούθως αυξομείωση αυτών (1800-3000) (**Γράφημα 5**). Ο μέσος όρος είναι 2402.



Γράφημα 5: Αριθμός στροφών ομάδας Β για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

Στην C ομάδα προς τα μέσα των ημερών καταγράφηκε αύξηση στροφών (5900) και ακολούθως μείωση αυτών (2900) (**Γράφημα 6**). Ο μέσος όρος είναι 3806.



Γράφημα 6: Αριθμός στροφών ομάδας C για το χρονικό διάστημα 30 ημερών.

3.3 Μέτρηση κατανάλωση τροφής (Πίνακας 2)

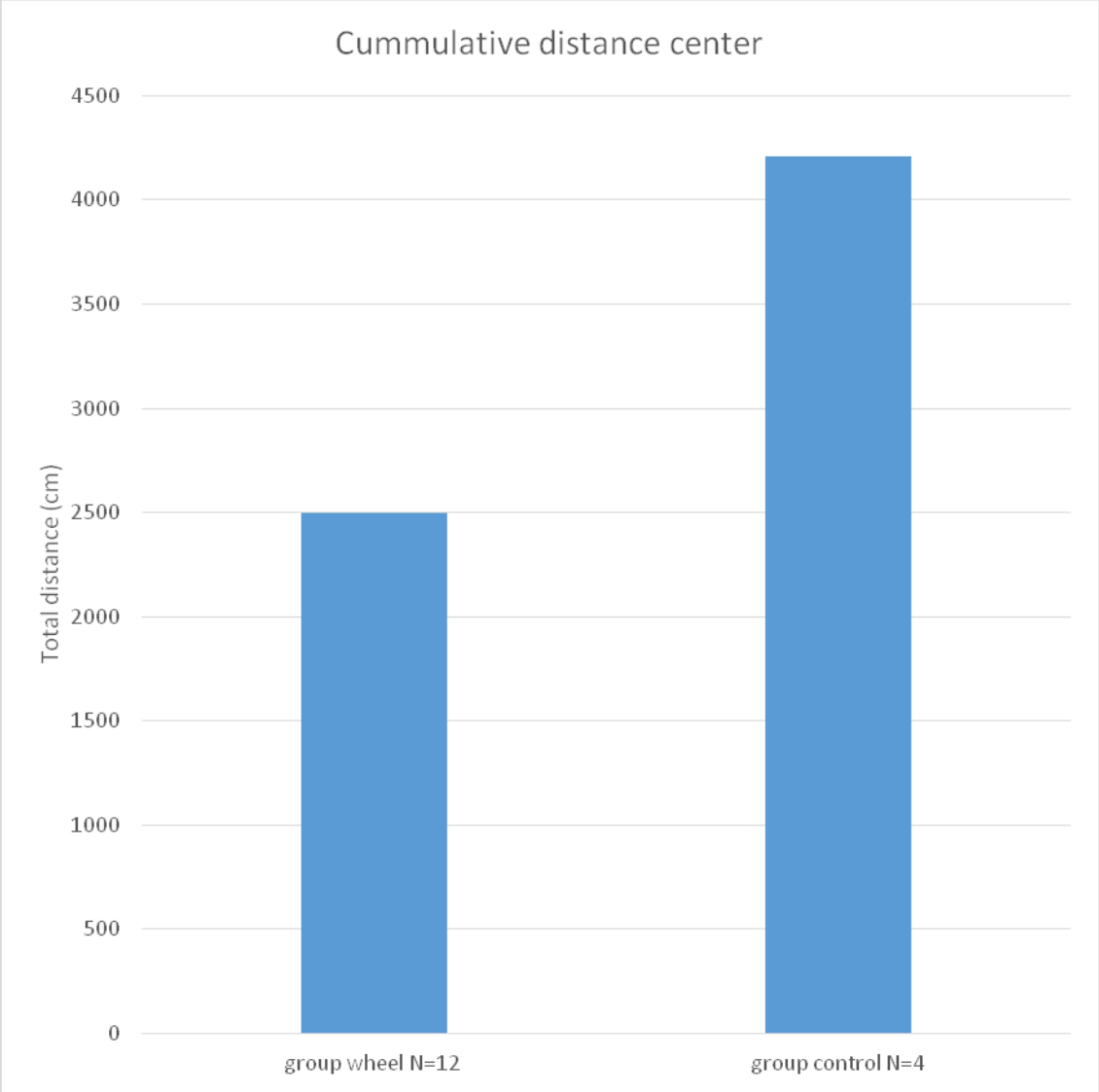
	Group A	Group B	Group C	Control
πρώτη βδομάδα	212.8 (g)	234.2 (g)	243 (g)	215.7 (g)
δεύτερη βδομάδα	211.6 (g)	340.2 (g)	361.2 (g)	301.2 (g)
τρίτη βδομάδα	275.6 (g)	318.4 (g)	399.8 (g)	341.3 (g)
τέταρτη βδομάδα	219.8 (g)	379.4 (g)	459.4 (g)	403.4 (g)

Πίνακας 2: Απεικονίζεται η κατανάλωση τροφής από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου, στο χρονικό διάστημα 30 ημέρων, η μέτρηση γινόταν μια φορά την βδομάδα, ίδια μέρα.

3.4 Συμπεριφορικά πειράματα

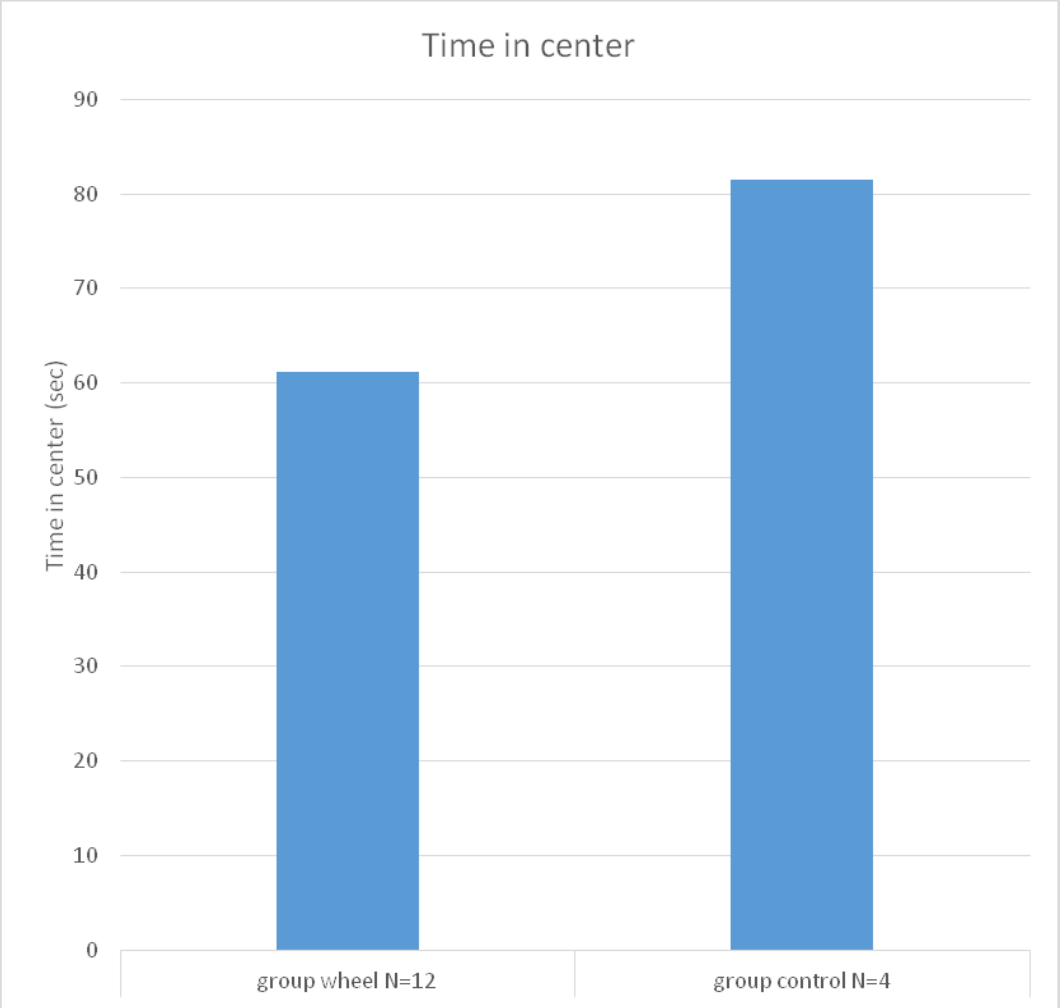
3.4.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Openfield)

Για τη δοκιμή ανοικτού πεδίου, οι μετρήσεις αφορούσαν τη συνολική απόσταση, ταχύτητα και χρόνο του επίμυ στην κεντρική περιοχή του πεδίου. Η εξέταση της συνολικής απόστασης από το κέντρο, ως δείκτης κινητικότητας, έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά (P = 0,0062). Οι ομάδες του τροχού μετακινήθηκαν στο κέντρο λιγότερο από την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 7**).



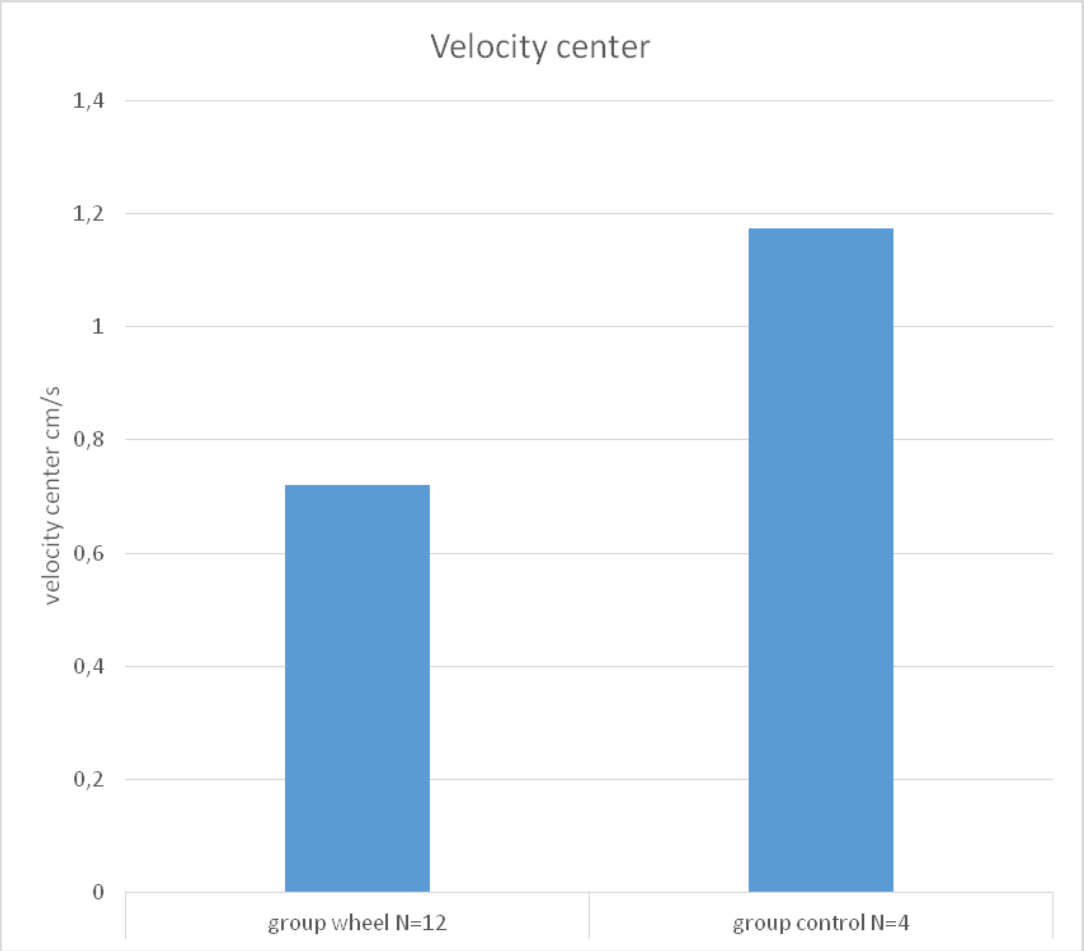
Γράφημα 7: Η συνολική απόσταση που διανύθηκε στην κεντρική περιοχή του κλωβού στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Όσον αφορά το συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε στο κεντρικό σημείο της διάταξης, ως δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς, ήταν στατιστικώς σημαντική διαφορά (0,0434). Οι επίμυες που είχαν τροχό στον κλωβό τους μετακινήθηκαν λιγότερο χρόνο από την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 8**).



Γράφημα 8: Συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στην κεντρική περιοχή στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Μια άλλη παράμετρος που εξετάστηκε με τη δοκιμή ανοικτού πεδίου ήταν η ταχύτητα στο κεντρικό σημείο της διάταξης, η οποία έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά (P = 0,01). Οι επίμυες στον τροχό είχαν μικρότερη ταχύτητα από την ομάδα ελέγχου (**Γράφημα 9**).

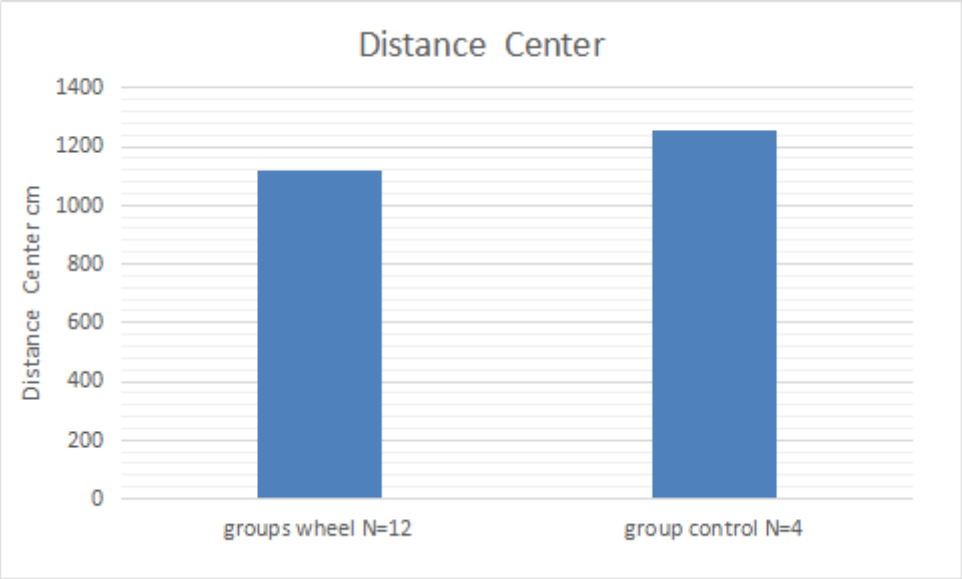


Γράφημα 9: Ταχύτητα στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

3.4.2 Υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze)

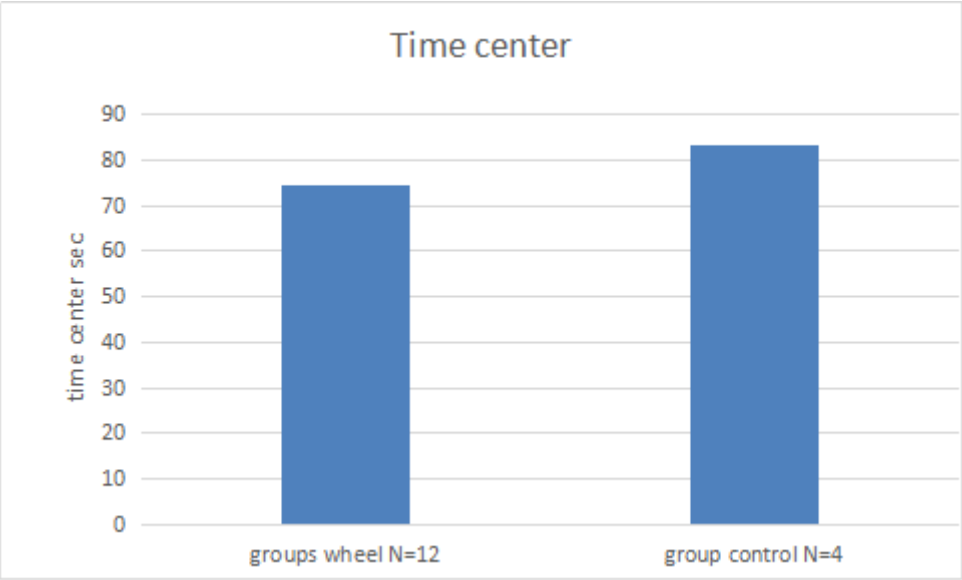
Για τη δοκιμή του ανυψωμένου λαβυρίνθου, μελετήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: η συνολική απόσταση, ο χρόνος, η ταχύτητα και η συχνότητα στο κέντρο, ο χρόνος που πέρασε το ζώο στους ανοιχτούς βραχίονες, στους κλειστούς. Υπολογίστηκε ο δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς όπως αυτός περιγράφεται από την εξίσωση: (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες- χρόνος στους ανοιχτούς)/ (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες + χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες).

Οι επίμυες που είχαν τροχό στον κλωβό τους έχουν διανύσει μικρότερη απόσταση στο κέντρο σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,4) (**Γράφημα 10**).



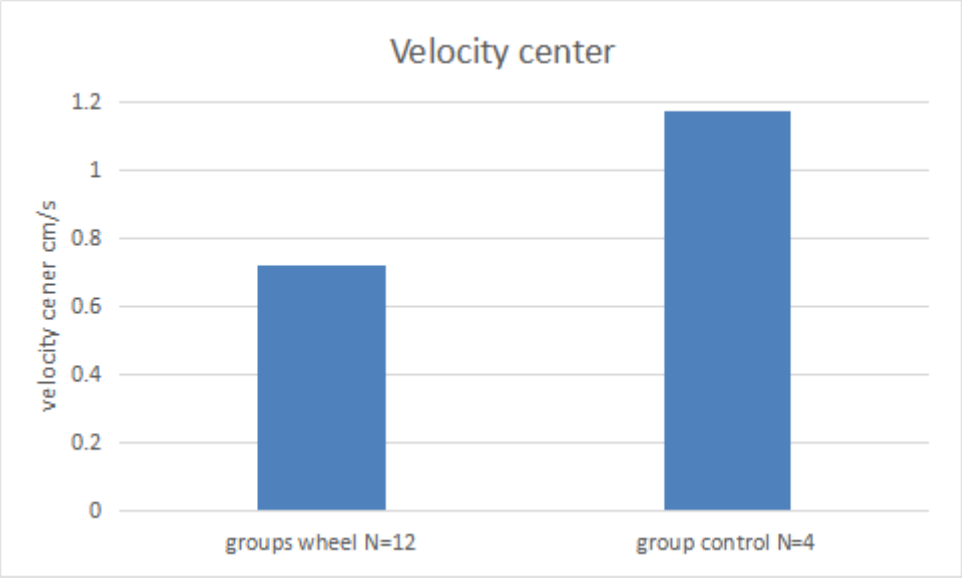
Γράφημα 10: Συνολική απόσταση στο κέντρο που διανύθηκε στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Οι επίμυες στο τροχό έχουν περάσει λιγότερο χρόνο στο κέντρο σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,5) (**Γράφημα 11**).



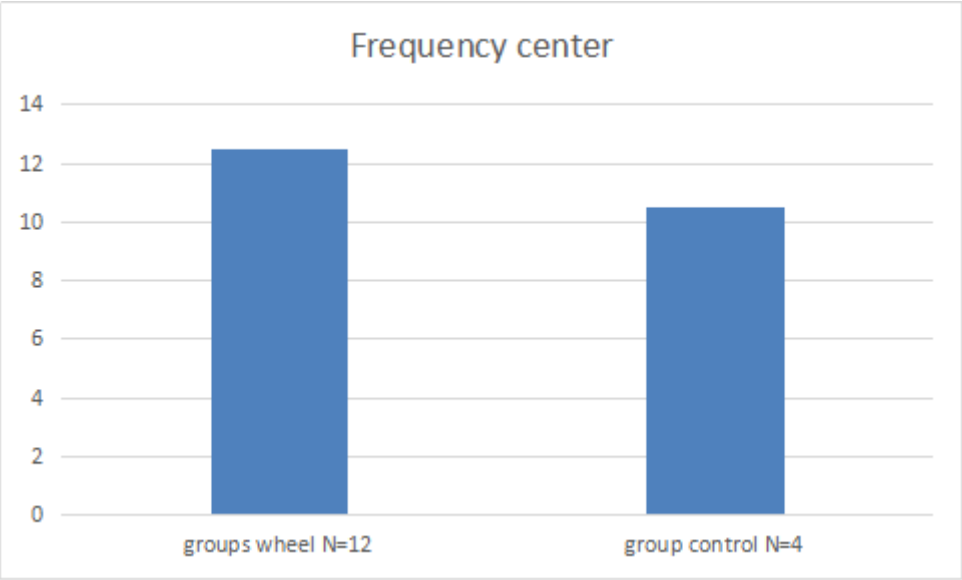
Γράφημα 11: Συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στην κεντρική περιοχή στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Οι επίμυες στο τροχό έχουν αναπτύξει μικρότερη ταχύτητα στο κέντρο σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,01) (**Γράφημα 12**).



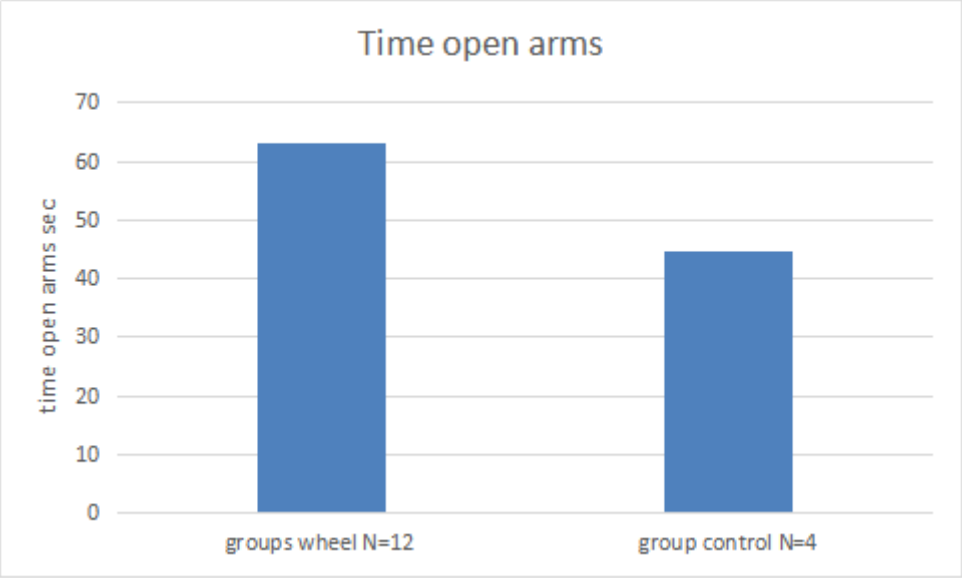
Γράφημα 12: Η ταχύτητα στην κεντρική περιοχή στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Οι επίμυες στον τροχό έχουν μεγαλύτερη συχνότητα στο κέντρο σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,28) (**Γράφημα 13**).



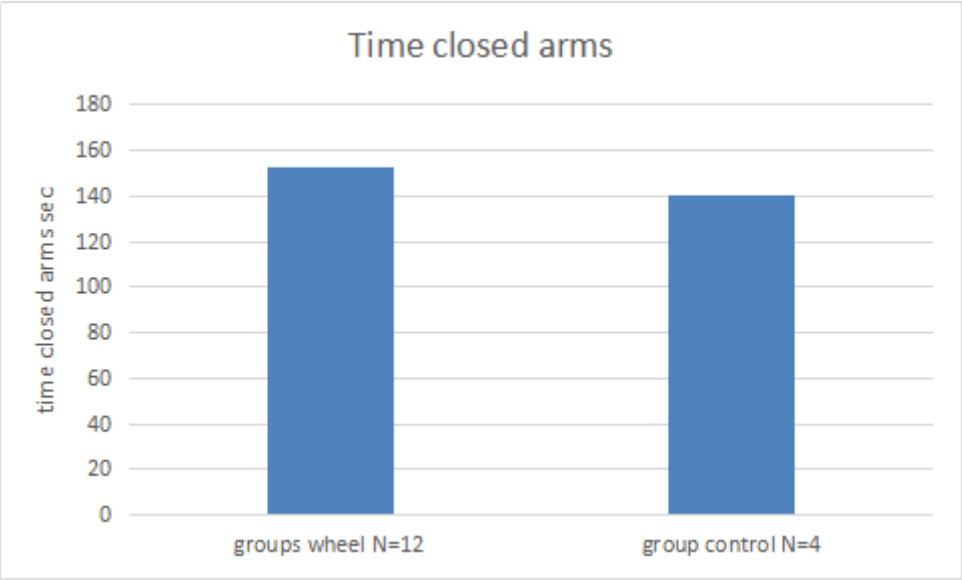
Γράφημα 13: Η συχνότητα στην κεντρική περιοχή στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Οι επίμυες στο τροχό πέρασαν περισσότερη ώρα στους ανοιχτούς βραχίονες σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,2) (**Γράφημα 14**).



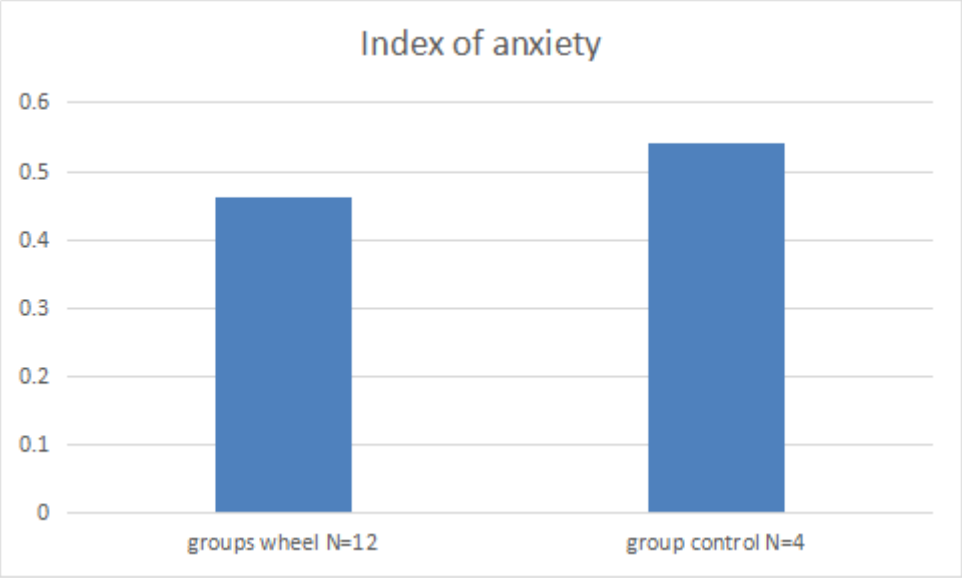
Γράφημα 14: Συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στους ανοιχτούς βραχίονες στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Οι επίμυες στο τροχό πέρασαν περισσότερη ώρα στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους επίμυες ελέγχου. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,7) (**Γράφημα 15**).



Γράφημα 15: Συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στους κλειστούς βραχίονες στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

Τέλος υπολογίστηκε ο δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς όπως αυτός περιγράφεται από την εξίσωση: (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες- χρόνος στους ανοιχτούς)/ (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες + χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες). Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά (p=0,3) (**Γράφημα 16**).



Γράφημα 16: Ο δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

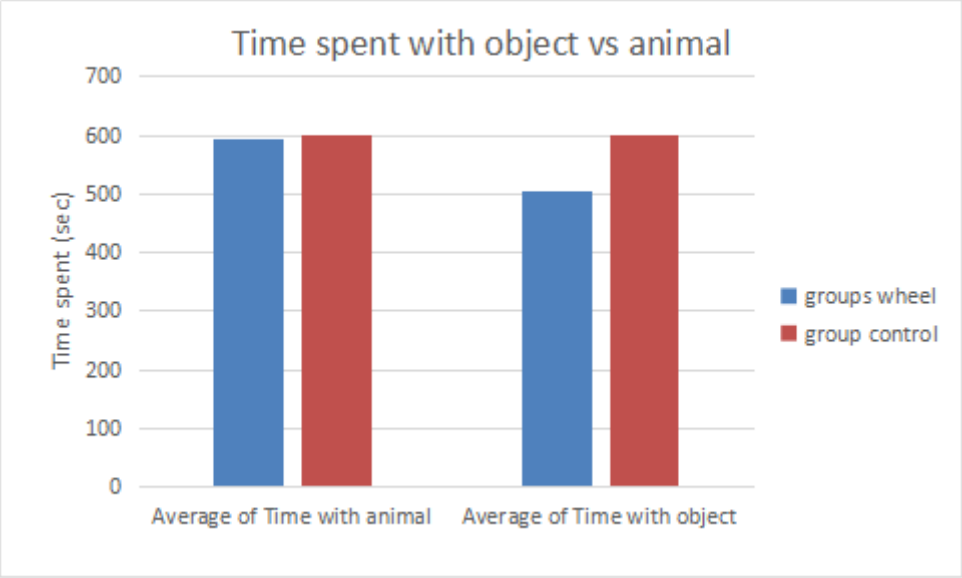
Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty)

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας για κοινωνική συμπεριφορά, υπολογίστηκε ο αριθμός εισόδων στο αριστερό και το δεξί δωμάτιο, ο χρόνος που δαπανήθηκε σε καθένα από αυτά, ο χρόνος που πέρασε ο επίμυς με το αντικείμενο και με τον άγνωστο επίμυ, καθώς και ο χρόνος που πέρασε με τον οικείο και τον νέο μη οικείο επίμυ.

i) Αρχικά, μετρήθηκε και αναλύθηκε ο χρόνος που δαπάνησε το υπό εξέταση ζώο στο αριστερό και δεξί δωμάτιο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε κάποια ενδογενής προτίμηση στον ένα από τους δυο χώρους. Η ανάλυση δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε στο αριστερό δωμάτιο (p=0,09), ούτε στο δεξί δωμάτιο (p=0,07).

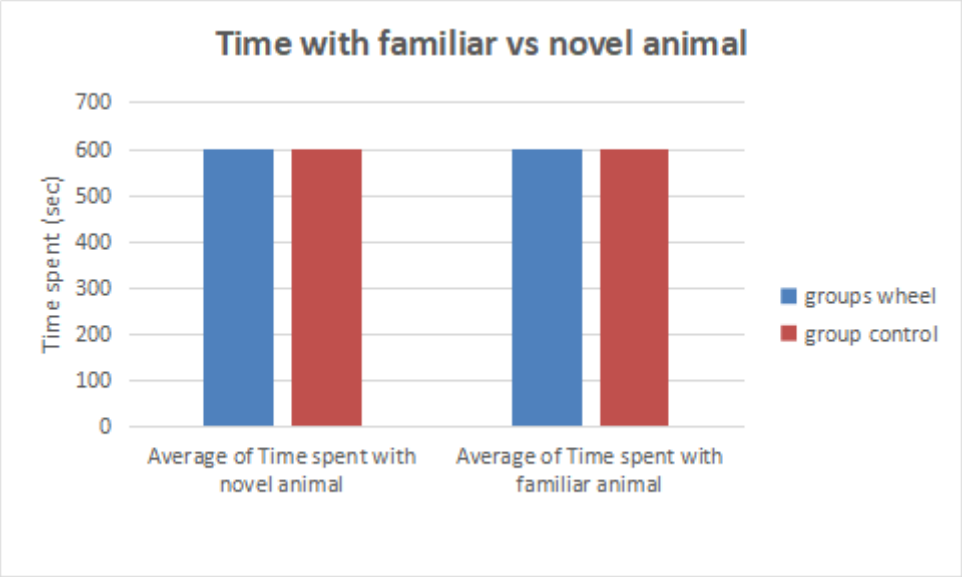
ii) Όσον αφορά τον αριθμό εισόδων στο αριστερό και στο δεξί δωμάτιο, οι οποίες μελετήθηκαν για τον ίδιο λόγο, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε στο αριστερό δωμάτιο (p=0,46), ούτε στο δεξί δωμάτιο (p=0,44).

iii) Για το δεύτερο trial, στο οποίο μελετάται η προτίμηση του επίμυ για κοινωνικότητα (νέο RccHan ζώο) έναντι ενός αντικειμένου (άδειος κλωβός), μελετήθηκε ο χρόνος που πέρασε ο επίμυς είτε στον άδειο κλωβό, είτε τον νέο επίμυ. Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ούτε στο αντικείμενο (p=0,7), ούτε στο νέο ζώο (p=0,5) (**Γράφημα 17**).



Γράφημα 17: Ο χρόνος που δαπανήθηκε με το αντικείμενο και το άγνωστο ζώο στο χρονικό διάστημα των 10 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

vi) Τέλος, όσον αφορά τον χρόνο που διήρκεσε η προτίμηση προς τον άγνωστο και τον οικείο επίμυ, δε βρέθηκε στατιστικώς καμία σημαντική διαφορά ούτε προς τον οικείο επίμυ (p=0,47) , ούτε προς τον άγνωστο (p=0,22) (**Γράφημα 18**).



Γράφημα 18: Ο χρόνος με οικείο και άγνωστο επίμυ στο χρονικό διάστημα των 10 λεπτών από τις ομάδες τροχού και την ομάδα ελέγχου.

3.4.3 Δοκιμή σωλήνα κοινωνικής κυριαρχίας (Social dominance tube test)

Τα αποτελέσματα από την δοκιμή κοινωνικής κυριαρχίας (**πίνακας 3**):

Group A	ηττημένοι
Group B	νικητές
Group C	ηττημένοι
Control	νικητές

Πίνακας 3 : Απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την δοκιμή κοινωνικής κυριαρχίας.

4 Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος της πυκνότητας στέγασης και της διαθεσιμότητας των τροχών στην συμπεριφορά και τη δραστηριότητα των αρσενικών επίμυων, μετά τον απογαλακτισμό τους. Η έκθεση στο εμπλουτισμένο περιβάλλον που δημιουργήθηκε ειδικά για αυτό το πρωτόκολλο αναμένουμε ότι θα αποτελέσει παράγοντα διαφοροποίησης της συμπεριφοράς των επιμύων.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να εκτιμήσει τη θετική ή αρνητική επίδραση της ύπαρξης τροχού σε ένα περιβάλλον όπου δημιουργήθηκε ανταγωνισμός για τη χρήση του. Η διαθεσιμότητα των τροχών ήταν περιορισμένη με δεδομένο το γεγονός ότι αντιστοιχούσε ένας τροχός για τέσσερα ζώα ενώ στα κανονικά κλωβοί στέγασης θα αντιστοιχούσε ένας τροχός για δυο ζώα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία για την πρώτη φάση της παρατήρησης η καθημερινή βιντεοσκόπηση και παρατήρηση των βίντεο για να γίνει αντιληπτό το μοτίβο χρήσης του τροχού (κατά πόσο δηλαδή η χρήση του προκαλεί ανταγωνισμό μέσα στην ομάδα). Μετρήθηκε επίσης το σωματικό βάρος και η κατανάλωση τροφής κάθε εβδομάδα για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει ομαλή ανάπτυξη των ζώων. Πράγματι, η ανάπτυξη των ζώων είναι σε αντιστοιχία τόσο με την ανάπτυξη των control όσο και με την καμπύλη ανάπτυξης των ζώων που έχει εκδώσει η εταιρεία εκτροφής.

Όσον αφορά την καθημερινή μέτρηση των στροφών, η B και η C ομάδα είχαν περίπου 2500-3500 στροφές με αύξηση αυτών εντός μιας εβδομάδας 3500-6000. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (223-227) το τρέξιμο στον τροχό ενισχύεται (228,229) καθώς μέρα με την μέρα υπάρχει προτίμηση του χώρου (228-234). Η ομάδα A είχε μέσο όρο στροφών 15416, καθώς έτρεχε πιο πολύ σε σχέση με την B και C που είχαν 2402 και 3806 αντίστοιχα. Είναι σαφές πως οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να καθορίσουν μεμονωμένες διαφορές (235-238).

Από τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών, φάνηκε ότι οι επίμυες έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου: στην συνολική απόσταση από το κέντρο ($P = 0,0062$), ως δείκτης κινητικότητας, στο συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε στο κεντρικό σημείο της διάταξης ($P=0,0434$), ως δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς, στην ταχύτητα στο κεντρικό σημείο της διάταξης ($P = 0,01$). Ωστόσο, στην δοκιμασία υπερυψωμένου λαβύρινθου δεν υπήρξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά. Οι

τρέχουσες δοκιμασίες άγχους δεν παρέχουν, ξεχωριστά, μια καθαρή και πλήρη εικόνα του συναισθηματικού προφίλ ενός ζώου, εφόσον αφορούν την εκτίμηση διαφορετικών πτυχών του άγχους. Πολλοί ερευνητές δοκιμάζουν τις πειραματικές τους υποθέσεις χρησιμοποιώντας μια σειρά από δοκιμές που σχετίζονται με το άγχος, οι οποίες θεωρείται ότι αντικατοπτρίζουν διαφορετικές πτυχές της συναισθηματικότητας (239).

Οι επίμυες στον τροχό είχαν αγχολυτική συμπεριφορά, καθώς τα αποτελέσματα της δοκιμής του ανοιχτού πεδίου έδειξαν πως ο τροχός είχε θετική επίδραση και εφόσον η αρένα ήταν παρόμοια με τον κλωβό που παρέμειναν. Από την άλλη πλευρά, οι επίμυες control εμφάνισαν αγχωτική συμπεριφορά στο ανοιχτό πεδίο. Οι παράγοντες ήταν κυρίως δύο : αρχικά η ατομική δοκιμή (το ζώο χωρίζεται από την κοινωνική του ομάδα) και έπειτα η αγοραφοβία (καθώς η αρένα είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με το κλωβό του). Είναι σαφές πως οι παραπάνω παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν συμπεριφορά άγχους σε είδη που αναγκάζονται και δείχνουν φόβο σε ανοιχτούς χώρους. Ειδικά για τα τρωκτικά που ζουν σε κοινωνικές ομάδες και σε μικρές σήραγγες.

Στα αποτελέσματα του υπερυψωμένου λαβύρινθου, παρατηρούμε πως δεν υπάρχει καμία στατιστική σημαντική διαφορά (επίμυες τροχού και control), καθώς τα ζώα είχαν να επιλέξουν ανάμεσα σε ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες. Η απροθυμία των ζώων να εξερευνήσουν τους ανοικτούς βραχίονες του υπερυψωμένου λαβύρινθου είναι ένας συνδυασμός της αποστροφής των τρωκτικών για ανοιχτούς χώρους και για το ύψος του λαβυρίνθου. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποστηρίζουν, ότι το ύψος μόνο δεν είναι επαρκώς έντονο αγχογόνο ερέθισμα και ότι η αποστροφή των τρωκτικών σε ανοιχτούς χώρους θα μπορούσε να σχετίζεται με "thigmotaxis", μια αντίδραση στην οποία το ζώο παραμένει κοντά σε κάθετες επιφάνειες, ως μέρος του φυσικής αμυντικής συμπεριφοράς. Φαίνεται πως η ύπαρξη τουλάχιστον δύο περιβαλλοντικών χώρων με ανοικτούς και κλειστούς βραχίονες, συμβάλλει για την ανάπτυξη αποφυγής ανοικτού βραχίονα στη δοκιμή υπερυψωμένου λαβύρινθου (240).

Τα τελευταία χρόνια, η τάση για αυτοματοποίηση της δοκιμής υπερυψωμένου λαβύρινθου προέτρεψε στην τυποποίηση των μετρήσεων και την αποφυγή της υποκειμενικής ερμηνείας της συμπεριφοράς των ζώων (241). Αν και αυτοματοποιημένα προγράμματα βαθμολόγησης επιτρέπουν την ανάλυση της κινητικής εξερεύνησης, μπορούν να καταγραφούν μόνο μερικά πρότυπα συμπεριφοράς. Επομένως, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πιο σύνθετες αναλύσεις βάσει παρατήρησης, με εκτίμηση το πλούσιο

εύρος συμπεριφοράς που εμφανίζεται από τα τρωκτικά (243,244,246). Επιπλέον, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δοκιμή αυτή μπορεί να υποδηλώνουν ότι η συναφή συναισθηματική αντίδραση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από παράμετρους διέγερσης (245,242). Σαφώς, οι εκφράσεις συμπεριφοράς που εμφανίζονται στο δοκιμή υπερυψωμένου λαβύρινθου αντιπροσωπεύουν ένα συνδυασμό διερευνητικής συμπεριφοράς και αποφυγής, καθώς και γενική δραστηριότητα, οι οποίες επηρεάζονται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Κατά συνέπεια, μπορεί να προκύψουν αποτελέσματα που επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες δοκιμής, τη διαδικασία και είναι απαραίτητο να αναγνωριστούν προσεκτικά αυτές οι μεταβλητές, για να καταλήξουμε στην συμπεριφορά άγχους των ζώων. Βάσει αυτών θεωρείται ότι θα υπάρξουν μελλοντικές μελέτες που θα αποκαλύπτουν την ακριβή δυνατότητα εφαρμογής της δοκιμής υπερυψωμένου λαβύρινθου στη φαρμακολογία και στη νευροβιολογία του φόβου και του άγχους. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθούν οι μεταβλητές που έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τα πρότυπα συμπεριφοράς που παρατηρούνται στη δοκιμή υπερυψωμένου λαβύρινθου (247) (**Πίνακας 3**).

Στην δοκιμή κοινωνικότητας και προτίμησης για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty) υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία βελτιώνουν την αξιοπιστία των δεδομένων για την εξέταση της κοινωνικότητας, της κοινωνικής αλληλεγγύης, της κοινωνικής μνήμης και της προτίμησης. Η κύρια ιδιαιτερότητα αυτής της δοκιμής είναι ο σχεδιασμός στον οποίο, το ζώο που τοποθετείται κάτω από ένα κυκλικό κλωβό από πλέγμα δεν μπορεί να κινηθεί ελεύθερα. Αυτό εμποδίζει την άμεση φυσική επαφή, εξαλείφοντας την πάλη και / ή την επιθετική συμπεριφορά, αλλά επιτρέπει αισθητικές αλληλεπιδράσεις (μυρωδιά, θέαμα, ήχο, γεύση). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το ζώο ξεκινά τυχόν αλληλεπιδράσεις, έχοντας πάντοτε την επιλογή μεταξύ άγνωστου ζώου ενάντια σε άδειο δοχείο (trial 1) ή μεταξύ γνωστού ποντικού (Stranger 1) έναντι του νέου ποντικού (Stranger 2) (trial 2). Η συσκευή των τριών θαλάμων είναι πολύ μεγαλύτερη από μια τυπική συσκευή απλού θαλάμου, η οποία επιτρέπει στο υποκείμενο ζώο να παραμείνει κοντά ή να μετακινηθεί μακριά από το άγνωστο ζώο. Έτσι, το επίπεδο άγχους στο τεστ κοινωνικότητας είναι χαμηλό και ως επί το πλείστον προκαλείται από την τοποθέτηση του πειραματικού επίμυ σε ένα νέο περιβάλλον. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως δεν υπήρξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα ανάμεσα στους επίμυες (τροχού, control). Επομένως, η ύπαρξη τροχού δεν επηρέασε το τελικό αποτέλεσμα σε αυτή την δοκιμασία. Η

δοκιμή αυτή αποδείχθηκε αποτελεσματική στην διερεύνηση της κοινωνικής συμπεριφοράς των επίμυων. Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες αυτοματοποίησης της δοκιμασίας των τριών θαλάμων, αυτή εξακολουθεί να έχει κάποια μειονεκτήματα: αφενός, μετράει το χρόνο που αφιερώνουν τα ζώα σε κάθε ένα από τα τρία διαμερίσματα της διάταξης, αντί να μετρά την επαφή των δύο ζώων. Ενώ δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη συμμετοχή άλλων παραμέτρων συμπεριφοράς, όπως η προτίμηση χώρου, η οποία μπορεί να είναι ανεξάρτητη από το κίνητρο να διερευνηθεί ένα συγκεκριμένο κοινωνικό ερέθισμα υπό ορισμένες συνθήκες. Δεύτερον, η θέση του ερεθίσματος σε ένα κλωβό κυκλικού σύρματος εντός της διάταξης δημιουργεί δυσκολίες για την ακριβή συσχέτιση συγκεκριμένων γεγονότων διερεύνησης με άλλες μετρούμενες παραμέτρους, όπως η φωνητική δραστηριότητα.

Η δοκιμή σωλήνων έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων μέτρησης της κοινωνικής κυριαρχίας. Πρώτον, σε σύγκριση με τις δοκιμασίες που βασίζονται σε βαθμολογίες επιθετικών και αμυντικών συμπεριφορών ή στον ανταγωνισμό τροφίμων και νερού, οι οποίες συχνά απαιτούν ώρες βιντεοσκόπησης, παρακολούθηση ζώων και ποσοτικοποίηση συμπεριφοράς, η δοκιμή σωλήνα χρησιμοποιεί εύκολες διαδικασίες και βαθμολόγηση και απαιτεί απλό εξοπλισμό. Δεύτερον, σε αντίθεση με την κοινωνική ήττα, λόγω εισβολέα κατοίκου ή άλλους προσδιορισμούς βασισμένους σε επίθεση, η δοκιμή σωλήνα δεν συνεπάγεται βίαιες επιθέσεις και ελαχιστοποιεί σωματικούς τραυματισμούς. Τρίτον, κάθε ζώο μπορεί να αποκτήσει μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων. Σαφώς, λίγα ζωικά μοντέλα μπορούν να μοντελοποιήσουν πλήρως την κατάσταση που επικρατεί στο φυσικό περιβάλλον ή στην ανθρώπινη κοινωνία, και όλα έχουν ορισμένους περιορισμούς και επιφυλάξεις. Η δοκιμή σωλήνα έχει επίσης περιορισμούς. Πρώτον πολλοί παράγοντες, όπως η ηλικία, το βάρος και το βασικό επίπεδο πίεσης, μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας σωλήνα. Πράγματι, η επίδραση του στρες κατά τη διεξαγωγή του δοκιμαστικού σωλήνα είναι ένα θέμα που αξίζει να μελετηθεί. Επομένως, η ηλικία και το βάρος των ζώων πρέπει να ταιριάζουν, και το οξύ στρες θα πρέπει να ελαχιστοποιείται. Δεύτερον, η κοινωνική αναγνώριση, κοινωνική μνήμη και μετακίνηση μπορούν επίσης να επηρεάζουν τα αποτελέσματα των δοκιμών σωλήνα. Δεδομένου ότι κάθε μεμονωμένη ανάλυση συμπεριφοράς μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, προτείνουμε έντονα να χρησιμοποιήσουμε περισσότερα από δύο μέτρα κυριαρχίας, για παράδειγμα, η σήμανση των ούρων στην επικράτεια ή δοκιμασίες φωνητικής ακτινοβολίας με υπερήχους.

Με βάσει τα παραπάνω, καταλήγουμε πως θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο

αριθμό ζώων εργαστηρίου, διαφορετικών φυλών καθώς και παραλλαγές πρωτοκόλλων για τη διερεύνηση αυτών των συμπεριφορικών δοκιμών.

Στέλεχος
Φύλο
Οιστρικός κύκλος/ γαλακτοφορία
Ηλικία
Στέγαση
Κιρκαδικός ρυθμός/ φωτισμός
Προηγούμενος χειρισμός/ ένεση
Άγχος
Επίπεδο φωτισμού
Προηγούμενη εμπειρία σε δοκιμασία
Ανάλυση/ επαλήθευση μετρήσεων
Μέθοδος βαθμολογησης

Πίνακας 4: Μεταβλητές που έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τα πρότυπα συμπεριφοράς που παρατηρούνται στη δοκιμή EPM (247)

5 Βιβλιογραφία

1. Levitis, Daniel; William Z. Lidicker, Jr, Glenn Freund (June 2009). "Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour". Animal Behaviour (78).
2. Matthew A. Nystoriak and Aruni Bhatnagar Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise 2018; 5: 135.
3. Visser L de, Bos R van den, Spruijt BM. Automated home cage observations as a tool to measure the effects of wheel running on cage floor locomotion. Behav Brain Res. 2005;160:382–388.
4. Meijer JH, Robbers Y. Wheel running in the wild. Proc Biol Sci. 2014;281:20140210.
5. Landisch RM, Kosir AM, Nelson SA, Baltgalvis KA, Lowe DA. Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. Muscle Nerve. 2008;38:1290–1303.
6. Personius KE, Jayaram A, Krull D, Brown R, Xu T, Han B, et al. Grip force, EDL contractile properties, and voluntary wheel running after postdevelopmental myostatin depletion in mice. J Appl Physiol. 2010;109:886–894.
7. Goh J, Ladiges W. Voluntary wheel running in mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2015;5:283–290.
8. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. J Appl Physiol. 2001;90:1900–1908.
9. Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ, Abresch RT, Fowler WM. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. Neuromuscul Disord. 1995;5:323–332.
10. McMullan RC, Kelly SA, Hua K, Buckley BK, Faber JE, Pardo-Manuel de Villena F, et al. Long-term exercise in mice has sex-dependent benefits on body composition and metabolism during aging. Physiol Rep. 2016;4:e13011.
11. De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. Am J Physiol Integr Comp Physiol. 2006;290:R926–R934.
12. Goh J, Ladiges W. Voluntary wheel running in mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2015;5:283–290.

13. R.K. Dishman, Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models, Med. Sci. Sports Exerc. 29 (1997) 63 – 74.
14. A.L. Dunn, R.K. Dishman, Exercise and the neurobiology of depression, Exerc. Sport Sci. Rev. 19 (1991) 41 – 98.
15. R. Meeusen, K. De Meirleir, Exercise and brain neurotransmission, Sports Med. 20 (1995) 160 – 188.
16. G.A. Sforzo, Opioids and exercise. An update, Sports Med. 7 (1989) 109 – 124
17. F. Chaouloff, Influence of physical exercise on 5-HT1A receptor- and anxiety-related behaviours, Neurosci. Lett. 176 (1994) 226 – 230.
18. R.K. Dishman, A.L. Dunn, S.D. Youngstedt, J.M. Davis, M.L. Burgess, S.P. Wilson, M.A. Wilson, Increased open field locomotion and decreased striatal GABAA binding after activity wheel running, Physiol. Behav. 60 (1996) 699 – 705.
19. P. Hoffmann, P. Thoren, D. Ely, Effect of voluntary exercise on openfield behavior and on aggression in the spontaneously hypertensive rat (SHR), Behav. Neural Biol. 47 (1987) 346 – 355.
20. L.J. Fulk, H.S. Stock, J.D. Marshall, A.J. Lynn, M.A. Wilson, G.A. Hand, Chronic treadmill training reduces acute anxiety-related behaviors in rats, Int. J. Sports Med. 24 (2003) 1 – 5.

21. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH (1998a) Investigations into the preferences of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials.Laboratory Animals 32, 23–35
22. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH (1998b) Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nestboxes and nesting materials. Laboratory Animals 32, 36–41
23. Ras T, Van de Ven M, Patterson-Kane EG, Nelson K (2002) Rats' preferences for corn versus woodbased bedding and nesting materials. Laboratory Animals 36, 420–5
24. Lindsey J.R., 1979. Historical foundations. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S.H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. I. Academic Press, New York.
25. National Research Council, Use of Laboratory Animals in biomedical and Behavioral research, National Academy Press, Washington, D.C. 1998.
26. Van Hoosier G. L., 1975 (Ed.). The Rat (Slide-Tape Program). American College of Laboratory Animal Medicine, Pullman, WA, V-6079-21.
27. Beaudoin A.R, 1980. Embryology and Teratology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. II. Academic Press, New York.
28. Briggs G.B., Oehme F.W., 1980. Toxicology In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. II. Academic Press, New York.
29. Peckham J.C., 1980. Experimental oncology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. II. Academic Press, New York.
30. Burek J.D., Hollander C.F., 1980. Experimental Gerontology. In: Baker H. J., Lindsey J.R., Weisbroth S. H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. II. Academic Press, New York.
31. Weihe WJ. The laboratory rat. In: Pool T (ed). The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 6th edition. Longman Churchill Livingstone, London, 1987: 309-330
32. Πέτρος Κ. Υψηλάντης 2011. Αρχές διαχείρισης ζώων εργαστηρίου σελ. 105-109
33. Επίσημη ιστοσελίδα ENVIGO https://www.envigo.com/products-services/research-models-services/models/research-models/rats/outbred/wistar-han-outbred-rat/rcchanwist/
34. P. J. PAHLT 1969, GROWTH CURVES FOR BODY WEIGHT OF THE LABORATORY RAT* AUBt. J. biol. Sci. 1077-80

35. Despommier D. D., 1980. Experimental parasitology. In: Baker H. J., Lindsey J. R., Weisbroth S. H., (Eds.) The Laboratory Rat. Vol. II. Academic Press, New York.
36. Γαλακτίδου G. Φυλές πειραματοζώων - χρήση. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο “Προστασία των πειραματόζωων (τρωκτικών - κονίκλων) - Χρήση στην κλινική έρευνα και διαγνωστική -Εναλλακτικές μέθοδοι”. Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 1993
37. Havenaar R, Meijer JC, Morton DB, Ritskes-Hoiting J, Zwart P. Biology and husbandry of laboratory animals. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beyen AC (eds). Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 17-75
38. Levitis, Daniel; William Z. Lidicker, Jr, Glenn Freund (June 2009). "Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour". Animal Behaviour (78).
39. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition.
40. Spruijt, B. M., van Hooff, J. A., & Gispen, W. H.(1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. Physiological Reviews, 72, 825– 852.
41. Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: Potential utility for neurobehavioural stress research. Journal of Neuroscience Methods, 143, 169 –177.
42. Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. Psychology & Neuroscience,5, 105–112.
43. Bradshaw AL, Poling A (1991) Choice by rats for enriched versus standard home cages: plastic pipes, wood platforms, wood chips, and paper towels as enrichment items. Journal of the Experimental Analysis of Behavior 55, 245–50.
44. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH (1998a) Investigations into the preferences of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials.Laboratory Animals 32, 23–35.
45. Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH (1998b) Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nestboxes and nesting materials. Laboratory Animals 32, 36–41.
46. Ras T, Van de Ven M, Patterson-Kane EG, Nelson K (2002) Rats’ preferences for corn versus woodbased bedding and nesting materials. Laboratory Animals 36, 420–5.

47. Denenberg VH, Taylor RE, Zarrow MX (1969) Maternal behavior in the rat: an investigation and quantiŽ cation of nest building. Behaviour 34, 1–16.
48. Dell PA, Rose FD (1987) Transfer of effects from environmentally enriched and impoverished female rats to future offspring. Physiology & Behavior 39, 187–90
49. P. L. P. Van Loo1 & V. Baumans (2004) The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats.
50. Barnett SA. 1975. The rat: a study in behavior, revised edn Chicago, IL: The University of Chicago Press.
51. Huck UW, Price EO. 1976. Effect of the post-weaning environment on the climbing behaviour of wild and domestic Norway rats. Anim. Behav. 24, 364–371.Grant EC, Mackintosh JH. 1963. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. Behaviour 21, 246–259.
52. Grant EC, Mackintosh JH. 1963. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. Behaviour 21, 246–259.
53. I. Joanna Makowska and Daniel M. Weary 2016. The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats.
54. Soffié M, Buhot MC, Poucet B. 1992. Cognitive and noncognitive processes involved in selective object exploration: comparison between young adult and old rats. Physiol. Behav. 52, 1029–1035.
55. Willig F, Palacios A, Monmaur P, M'Harzi M, Laurent J, Delacour J. 1987. Short-term memory, exploration and locomotor activity in aged rats. Neurobiol. Aging 8, 393–402.
56. Goodrick CL. 1971. Variables affecting free exploration responses of male and female Wistar rats as a function of age. Dev. Psychol. 4, 440–446.
57. Calhoun JB. 1963. The ecology and sociology of the Norway rat. Washington, DC: Public Health Service Publication No. 1008.
58. Pisano RG, Storer TI. 1948. Burrows and feeding of the Norway rat. J. Mammal. 29, 374–383.
59. Blanchard RJ, Blanchard DC. 1990. Anti-predator defense as models of animal fear and anxiety. In Fear and defense (eds Brain PF, Parmigiani RJ, Blanchard DC, Mainardi D.), pp. 89–108. London, UK: Harwood Academic Publishers.
60. Schlingmann F, Pereboom WJ, Remie R. 1993. The sensitivity of albino and pigmented rats to light: a mini review. Anim. Technol. 44, 71–85.

61. Schlingmann F, De Rijk SHLM, Pereboom WJ, Remie R. 1993. ‘Avoidance’ as a behavioural parameter in the determination of distress amongst albino and pigmented rats at various light intensities. Anim. Technol. 44, 87–96.
62. Canals M, Bozinovic F. 2011. Huddling behavior as critical phase transition triggered by low temperatures. Complexity 17, 35–43
63. Alberts JR. 2007. Huddling by rat pups: ontogeny of individual and group behavior. Dev. Psychobiol. 49, 22–32.
64. Alberts JR. 1978. Huddling by rat pups: multisensory control of contact behavior. J. Comp. Physiol. Psychol. 92, 220–230.
65. Alberts JR. 2012. Observe, simplify, titrate, model, and synthesize: a paradigm for analyzing behavior. Behav. Brain Res. 231, 250–261.
66. Ventura, R., Majolo, B., Koyama, N. F., Hardie, S. & Schino, G. Reciprocation and interchange in wild Japanese macaques: grooming, cofeeding, and agonistic support. Am. J. Primatol. 68, 1138–1149 (2006).
67. Gumert, M. D. & Ho, M.-H. R. The trade balance of grooming and its coordination of reciprocation and tolerance in Indonesian long-tailed macaques (Macaca fascicularis). Primates 49, 176–185 (2008).
68. Adams D. B., Cowan C. W., Marshall M. E., Stark J. (1994). Competitive and territorial fighting: two types of offense in the rat. Physiol. Behav. 55, 247–254.
69. Gosling L. M., Roberts S. C. (2001b). Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. Adv. Study Behav. 30, 169–217.
70. Beynon R. J., Hurst J. L. (2004). Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. Peptides 25, 1553–1563.
71. Roberts S. A., Simpson D. M., Armstrong S. D., Davidson A. J., Robertson D. H., McLean L., et al. . (2010). Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male’s odour.
72. Lavenex P., Schenk F. (1998). Olfactory traces and spatial learning in rats. Anim. Behav. 56, 1129–1136.
73. Wallace D. G., Gorny B., Whishaw I. Q. (2002). Rats can track odors, other rats, and themselves: implications for the study of spatial behavior. Behav. Brain Res. 131, 185–192.

74. Porter J., Anand T., Johnson B., Khan R. M., Sobel N. (2005). Brain mechanisms for extracting spatial information from smell. Neuron 47, 581–592.
75. Haller J, Kruk MR (2006) Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. Neurosci Biobehav Rev 30: 292–303
76. BLANCHARD, R. J., & BLANCHARD, D. C. Aggressive behavior in the rat. Behavioral Biology, 1977 197-224.
77. LEHMAN, M. N., & ADAMS, D. B. A statistical and motivational analysis of the social behaviors of the male laboratory rat. Behaviour, 1977.
78. Guevara-Guzman, R., Barrera-Mera, B., and Weiss, M. L. (1997). Effect of the estrous cycle on olfactory bulb response to vaginocervical stimulation in the rat: results from electrophysiology and Fos immunocytochemistry experiments. Brain Res. Bull. 44, 141–149.
79. Matsuoka, M., Yoshida-Matsuoka, J., Sugiura, H., Yamagata, K., Ichikawa, M., and Norita, M. (2002). Mating behavior induces differential Arc expression in the main and accessory olfactory bulbs of adult rats. Neurosci. Lett. 335, 111–114.
80. Davison G. C., Neale J. M., 1998. Abnormal Psychology. New York: John Wiley & Sons, Inc
81. Jelinek V (1967) In: Husbandry of Laboratory Aninwals. Ed. M L Conalty. New York; p 100.
82. McCoy R H (1949) In: The Rat in Laboratory Investigation. Ed. J Q Griffith jr & E J Farris. 2nd ed. New York; p 80.
83. Odberg, F. 1986. The jumping stereotypy in the bank vole (Clethrionomys glareolus). Biol. Behav., 11, 130-143
84. Fox, M. W. 1965. Environmental factors influencing stereotyped and allelomimetic behavior in animals. Lab. Anita. Care, 15, 363-370.
85. Odberg, F. 1978. Abnormal behaviours: (stereotypies). In: Proceedings of the 1st Worm Congress on Ethology Applied to Zootechnics (Editorial Garsi), pp. 475480. Madrid: Industrias Graficas Espana
86. Wiepkema, P. R. 1983. On the significance of ethological criteria for the assessment of animal welfare. In: Indicators Relevant to Farm Animal Welfare (Ed. by D. Schmidt), pp. 71-79. The Hague: Martinus Nijhoff.

87. .Feldman, R. S. & Green, K. F. 1967. Antecedents to behaviour fixations. Psychol. Rev., 74, 250-271.
88. .Berkson, G. 1967. Abnormal stereotyped motor acts. In: Comparative Psychopathology: Animal and Human (Ed. by J. Zubin & H. F. Hunt), pp. 76-94. New York: Grune & Stratton.
89. .Fentress, J. C. 1977. The tonic hypothesis and the patterning of behavior. Ann. N.Y. Acad. Sci., 290, 37-395.
90. Levy, D. M. 1944. On the problem of movement restraint. Am. J. Orthopsychiat., 14, 644-577.
91. Hinde, R. A. 1970. Animal Behaviour. 2nd edn. New York: McGraw-Hill.
92. Robbins, T. W. & Sahakian, B. J. 1981. Behavioural and neurochemical determinants of drug-induced stereotypy. In: Metabolic Disorders of the Nervous System (Ed. by F. Clifford Rose), pp. 244-291. Progress in Neurobiology Series. London: Pitman.
93. Robbins, T. W. 1976. Relationship between rewardenhancing and stereotypical effects of psychomotor stimulent drugs. Nature, Lond., 264, 57-59.
94. Brianna N Gaskill and Kathleen R Pritchett Corning 2015 Effect of Cage Space on Behavior and Reproduction in Crl:CD(SD) and BN/Crl Laboratory Rats pp. 1-10.
95. Baumans V. The welfare of laboratory mice. In: Kaliste E, editor. Te welfare of laboratory animals. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2007 p. [119-152].
96. Kostomitsopoulos N. Environmental enrichment for laboratory animals in practice. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 2009 p. [222-226]
97. .Baumans V. Environmental enrichment: A right for rodents! In: Balls M, Van Zeller EM and Halder M, editors. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: Elsevier BV; 2000 p. [1251-1255]
98. Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system." Nat Rev Neurosci 7(9): 697-709.
99. Young RJ. Environmental enrichment for captive animals. Blackwell Publishing; 2003
100. Van Loo PLP, Croes IAA and Baumans V. Music for mice: Does it affect behaviour and physiology? Abstract, Telemetry Workshop. FELASA meeting, Nantes, France;2004
101. Sztainberg Y and Chen A. An environmental enrichment model for mice. Nature protocols. 2010 p 1535-1539.

102. Roy V, Belzung C, Delarue C, et al. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. Physiology & behavior. 2001; p. [313-320]
103. Mattson MP, Duan W, Lee J, et al. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. Mechanisms of ageing and development. 2001 p. [757-778]
104. .Lambert TJ, Fernandez SM and Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. Neurobiology of learning and memory. 2005; p. [206-216].
105. Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, et al. Effectsof different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. Hormones and Behavior. 2003 p. 281-292.
106. Pham TM, Winblad B, Granholm AC, et al. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2002 p. [167-175]
107. Larsson F, Winblad B and Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. Impoverished housed rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2002 p. 193-207.
108. Van Praag H, Kempermann G and Gage FH. Neural consequences of enviromental enrichment. Nature Reviews Neuroscience 2000 p. 191-198.
109. Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. European Journal of Neuroscience. 2004 p. 1341-1347.
110. Bruno WE, Rosenzweig MR, Bennett EL, et al. Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. Journal of comparative and physiological psychology. 1977 p. 33-50.
111. Fox C, Merali Z and Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. Behavioural brain research. 2006 p.1-8.
112. Hutchinson, K. M., K. J. McLaughlin, et al. (2012). "Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity." Neurobiol Learn Mem 97(2): 250-260.

113. Hutchinson, E., A. Avery, et al. (2005). "Environmental enrichment for laboratory rodents." ILAR J 46(2): 148-161.
114. van Praag, H., G. Kempermann, et al. (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci 1(3): 191-198.
115. Mattson, M. P. and T. Magnus (2006). "Ageing and neuronal vulnerability." Nat Rev Neurosci 7(4): 278-294.
116. Baumans V, Clausing P, Hubrecht R, et al. Report by FELASA Working Group on Standardization of Enrichment. Web guides. 2006.
117. Guillen J. FELASA guidelines and recommendation, Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2012 p. 311-321.
118. European Commission. Commission Recommendation 2007/ 526/ EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal of the European Commission. 2007 p. 1-89.
119. Paronis E, Aexakos P, Dimitriou C, et al. Evaluation of the preference of mice on food intake-Preliminary study. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 2008 p. 168-174.
120. Kostomitsopoulos NG, Paronis E, Alexakos P, et al. The influence of the location of a nest box in an individually ventilated cage on the preference of mice to use it. Journal of Applied Animal Welfare Science. 2007 p. 111-121.
121. S.F. Maier, L.R. WatkinsStressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor Neurosci. Biobehav. Rev., 29 (2005), pp. 829-841
122. J. Amat, R.M. Aleksejev, E. Paul, L.R. Watkins, S.F. Maier Neuroscience, 165 (2010), pp. 1031-1038
123. M. Lucas, Y. Ilin, R. Anunu, O. Kehat, L. Xu, A. Desmedt, G. Richter-Levin Long-term effects of controllability or the lack of it on coping abilities and stress resilience in the rat Stress (2014), pp. 1-8,
124. T.L. Bale, W.W. Vale Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 44 (2004), pp. 525-557
125. R.J. Blanchard, C.R. McKittrick, D.C. BlanchardAnimal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems Physiol. Behav., 73 (2001), pp. 261-271
126. J.N. Crawley Social behavior tests for mice (2007)

127.S.S. Moy, J.J. Nadler, N.B. Young, A. Perez, L.P. Holloway, R.P. Barbaro, J.R. Barbaro, L.M. Wilson, D.W. Threadgill, J.M. Lauder, T.R. Magnuson, J.N. CrawleyMouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains Behav. Brain Res., 176 (2007), pp. 4-20

128.J.N. Ferguson, L.J. Young, T.R. InselThe neuroendocrine basis of social recognition. Front Neuroendocr, 23 (2002), pp. 200-224

129.J.B. Panksepp, G.P. LahvisSocial reward among juvenile mice Genes Brain Behav., 6 (2007), pp. 661-671

130.M.I. Cordero, C. SandiStress amplifies memory for social hierarchy Front. Neurosci., 1 (2007), pp. 175-184

131.I. Ben-Ami Bartal, J. Decety, P. MasonEmpathy and pro-social behavior in rats Science, 334 (2011), pp. 1427-1430

132.I. Ben-Ami Bartal, D.A. Rodgers, M.S. Bernardez Sarria, J. Decety, P. MasonPro-social behavior in rats is modulated by social experience eLife, 3 (2014)

133. Ross, L.J. YoungOxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior Front. Neuroendocr, 30 (2009

134.K.A. Young, Y. Liu, Z. WangThe neurobiology of social attachment: a comparative approach to behavioral, neuroanatomical, and neurochemical studies Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 148 (2008), pp. 401-410

135.I.D. Neumann Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males J. Neuroendocrinol, 20 (2008), pp. 858-865

136.A.M. Kelly, J.L. GoodsonSocial functions of individual vasopressin–oxytocin cell groups in vertebrates: What do we really know? Front. Neuroendocrinol., 35 (2014), pp. 512-529

137.H.G.J. Everts, A.J.H. De Ruiter, J.M. KoolhaasDifferential lateral septal vasopressin in wild-type rats: correlation with aggression Horm. Behav., 31 (1997), pp. 136-144

138.L.J. Young Frank A. Beach Award. Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors Horm. Behav., 36 (1999), pp. 212-221

139.J.M. Koolhaas, S. De Boer, A. De Rutter, P. Meerlo, A. SgoifoSocial stress in rats and mice Acta Physiol. Scand. Suppl., 640 (1996), pp. 69-72

140.R.J. Blanchard, C.R. McKittrick, D.C. BlanchardAnimal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems Physiol. Behav., 73 (2001), pp. 261-271

141. A. Sgoifo, L. Carnevali, A.J. GrippoThe socially stressed heart. Insights from studies in rodents Neurosci. Biobehav. Rev., 39 (2014), pp. 51-60
142. A. Sgoifo, J. Koolhaas, S. De Boer, E. Musso, D. Stilli, B. Buwalda, P. MeerloSocial stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats Neurosci. Biobehav Rev., 23 (1999), pp. 915-923
143. S. Peters, N. Grunwald, P. Rümmele, E. Endlicher, A. Lechner, I.D. Neumann, F. Obermeier, S.O. ReberChronic psychosocial stress increases the risk for inflammation-related colon carcinogenesis in male miceStress, 15 (2011), pp. 403-415
144. A. Sgoifo, C. Pozzato, P. Meerlo, T. Costoli, M. Manghi, D. Stilli, G. Olivetti, E. MussoIntermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity Stress Int. J. Biol. Stress, 5 (2002), pp. 23-35
145. K.D. Nyuyki, D.I. Beiderbeck, M. Lukas, I.D. Neumann, S.O. ReberChronic subordinate colony housing (CSC) as a model of chronic psychosocial stress in male rats PLoS ONE, 7 (2012), p. e52371
146. B.S. McEwen, A.M. MagarinosStress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp., 16 (2001), pp. S7-S19
147. B. Buwalda, M.H.P. Kole, A.H. Veenema, M. Huininga, S.F. de Boer, S.M. Korte, J.M. KoolhaasLong-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning Neurosci. Biobehav. Rev., 29 (2005), pp. 83-97
148. B. Buwalda, K. Felszeghy, K.M. Horváth, C. Nyakas, S.F. de Boer, B. Bohus, J.M. KoolhaasTemporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat Physiol. Behav., 72 (2001), pp. 349-354
149. K. Braun, R. Antemano, C. Helmeke, M. Büchner, G. PoeggelJuvenile separation stress induces rapid region- and layer-specific changes in S100ss- and glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in astrocytes of the rodent medial prefrontal cortex Neuroscience, 160 (2009), pp. 629-638
150. E.S. Wohleb, M.L. Hanke, A.W. Corona, N.D. Powell, L.M. Stiner, M.T. Bailey, R.J. Nelson, J.P. Godbout, J.F. Sheridanβ-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci., 31 (2011), pp. 6277-6288

151. D.C. Blanchard, R.L. Spencer, S.M. Weiss, R.J. Blanchard, B. McEwen, R.R. SakaiVisible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates Psychoneuroendocrinology, 20 (1995), pp. 117-134
152. R.J. Blanchard, C.R. McKittrick, D.C. BlanchardAnimal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems Physiol. Behav., 73 (2001), pp. 261-271
153. J.J. ChristianPopulation density and reproductive efficiency Biol. Reprod., 4 (1971), pp. 248-294
154. J. Simpson, J.P. KellyThe impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects Behav. Brain Res., 222 (2011), pp. 246-264
155. A. Gamallo, A. Villanua, G. Trancho, A. FraileStress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats Physiol. Behav., 36 (1986), pp. 217-221
156. A. Gadek-Michalska, J. BugajskiRepeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc., 54 (2003), pp. 449-459
157. A.J. Grippo, A. Sgoifo, F. Mastorci, N. McNeal, D.M. TrahanasCardiac dysfunction and hypothalamic activation during a social crowding stressor in prairie voles Auton. Neurosci., 156 (2010), pp. 44-50
158. K.J. Brown, N.E. GrunbergEffects of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females Physiol. Behav., 58 (1995), pp. 1085-1089
159. Miczek KA, Faccidomo S, Fish EW, DeBold JF. Neurochemistry and Molecular Neurobiology of Aggressive Behavior. In: Blaustein J, editor. Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology. 3. New York: Springer; 2007. pp. 285–336.
160. Berkowitz L. Aggression: Its causes, consequencecs and control. Philadelphia: Temple University Press; 1993.
161. Baron RA, Richardson DR. Human aggression. 2. New York: Plenum Press; 1994.
162. Scott JP. Agonistic behavior of mice and rats: a review. Am Zool. 1966;6:683–701.
163. Maynard Smith J, Price GR. The logic of animal conflict. Nature. 1973;246:15–18.
164. Haller J. Biochemical background for an analysis of cost-benefit interrelations in aggression. Neurosci Biobehav Rev. 1995;19:599–604.

165. Miczek KA, O'Donnell JM. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. Psychopharmacology. 1978;57:47–55.
166. Blanchard RJ, Blanchard DC. Aggressive behavior in the rat. Behav Biol. 1977;21:197–224.
167. Blanchard DC, Blanchard RJ. What can animal aggression research tell us about human aggression? Horm Behav. 2003;44:171–177.
168. Palanza P, Parmiglani S, vom Saal FS. Maternal aggression toward infanticidal males of different social status in wild house mice (Mus musculus domesticus) Aggress Behav. 1994;20:267–274.
169. Noirot E, Goyens J, Buhot MC. Aggressive behavior of pregnant mice toward males. Horm Behav. 1975;6:9–17.
170. Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD. Postpartum aggression in rats: II. Dependence on maternal sensitivity to young and effects of experience with pregnancy and parturition. J Comp Physiol Psychol. 1980;94:495–505.
171. Blanchard, R. J., and Blanchard, D. C. (1977). Aggressive behavior in the rat. Behav. Biol. 21, 197–224.
172. Blanchard, R. J., Wall, P. M., and Blanchard, D. C. (2003). Problems in the study of rodent aggression. Horm. Behav. 44, 161–170.
173. Blanchard, R. J., and Blanchard, D. C. (1981). "The organization and modeling of animal aggression," in The Biology of Aggression, eds P. F. Brain and D. Benton (Alphen aan den Rijn: Sijthoff et Noordhoff), 529–563.
174. Haller, J., and Kruk, M. R. (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. Neurosci. Biobehav. Rev. 30, 292–303.
175. Adams DB. Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. Neurosci Biobehav Rev. 2006;30:304–318.
176. Plotsky P. M., Owens M. J., Nemeroff C. B. (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic– pituitary–adrenal axis. Psychiatr. Clin. North Am. 21, 293–307
177. Mello A. A., Mello M. F., Carpenter L. L., Price L. H. (2003). Update on stress and depression: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. Rev. Bras. Psiquiatr. 25, 231–238

178. Haller J., Halasz J., Makara G. B., Kruk M. R. (1998). Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 337–344
179. Haller J., van de Schraaf J., Kruk M. R. (2001). Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression? J. Neuroendocrinol. 13, 102–107
180. Haller J., Kruk M. R. (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. Neurosci. Biobehav. Rev. 30, 292–303
181. Kruk M. R., Halasz J., Meelis W., Haller J. (2004). Fast positive feedback between the adrenocortical stress response and a brain mechanism involved in aggressive behavior. Behav. Neurosci. 118, 1062–1070
182. Davidson R. J., Putnam K. M., Larson C. L. (2000). Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation – a possible prelude to violence. Science 289, 591–594
183. Kim E (2002) Agitation, aggression, and disinhibition syndromes after traumatic brain injury. NeuroRehabilitation 17: 297–310.
184. Kanner AM (2004) Recognition of the various expressions of anxiety, psychosis, and aggression in epilepsy. Epilepsia 45 Suppl 2: 22–27.
185. Sachs GS (2006) A review of agitation in mental illness: burden of illness and underlying pathology. J Clin Psychiatry 67 Suppl 10: 5–12.
186. Halasz J, Liposits Z, Kruk MR, Haller J (2002a) Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. Eur J Neurosci 15: 561–569.
187. Martinez M, Calvo-Torrent A, Herbert J (2002) Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. Stress 5: 3–13.
188. Kruk MR, Van der Poel AM, Meelis W, Hermans J, Mostert PG, Mos J, Lohman AH. Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. Brain Res. 1983;260:61–79.
189. Siegel A, Roeling TA, Gregg TR, Kruk MR. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. Neurosci Biobehav Rev. 1999;23:359–389.
190. Landgraf R., Neumann I. D. (2004). Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. Front. Neuroendocrinol. 25, 150–176

191. Ferris C. F. (1992). Role of vasopressin in aggressive and dominant/subordinate behaviors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 652, 212–226
192. de Vries G. J., Miller M. A. (1998). Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. Prog. Brain Res.
193. Ferris CF, Melloni RH, Koppel G, Perry KW, Fuller RW, Delville Y. Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. J Neurosci. 1997;17:4331–4340.
194. Nelson RJ, Trainor BC. Neural mechanisms of aggression. Nat Rev Neurosci. 2007;8:536–546.
195. Faccidomo S, Quadros IMH, Takahashi A, Fish EW, Miczek KA. Infralimbic and dorsal raphé microinjection of the 5-HT(1B) receptor agonist CP-93,129: attenuation of aggressive behavior in CFW male mice. Psychopharmacology. 2012;222:117–128.
196. Brennan PA, Keverne EB. Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. Current Biology. 2004;14:R81–R89.
197. Keverne EB. Mammalian pheromones: from genes to behaviour. Curr Biol. 2002;12:R807–809.
198. Miczek KA. Intraspecies aggression in rats: effects of d-amphetamine and chlordiazepoxide. Psychopharmacologia. 1974;39:275–301.
199. Mos J, Olivier B. Quantitative and comparative analyses of pro-aggressive actions of benzodiazepines in maternal aggression of rats. Psychopharmacology. 1989;97:152–153.
200. Fish EW, Faccidomo S, DeBold JF, Miczek KA. Alcohol, allopregnanolone and aggression in mice. Psychopharmacology. 2001;153:473–483.
201. Pinna G, Agis-Balboa RC, Zhubi A, Matsumoto K, Grayson DR, Costa E, Guidotti A. Imidazenil and diazepam increase locomotor activity in mice exposed to protracted social isolation. Proc Nat Acad Sci U S A. 2006;103:4275–4280.
202. Gordon, J. A., and Hen, R. (2004). Genetic approaches to the study of anxiety. Annu. Rev. Neurosci. 27, 193–222.
203. Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B. N., and Hascoet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. Fundam. Clin. Pharmacol. 21, 567–574.
204. Landgraf, R., and Wigger, A. (2002). High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. Behav. Genet. 32, 301–314.

205. Bunck, M., Czibere, L., Horvath, C., Graf, C., Frank, E., Kessler, M. S., Murgatroyd, C., Muller-Myhsok, B., Gonik, M., Weber, P., Putz, B., Muigg, P., Panhuysen, M., Singewald, N., Bettecken, T., Deussing, J. M., Holsboer, F., Spengler, D., and Landgraf, R. (2009). A hypomorphic vasopressin allele prevents anxiety-related behavior. PLoS ONE 4, e5129.
206. Wigger, A., and Neumann, I. D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. Physiol. Behav. 66, 293–302.
207. Barrot, M., Wallace, D. L., Bolanos, C. A., Graham, D. L., Perrotti, L. I., Neve, R. L., Chambliss, H., Yin, J. C., and Nestler, E. J. (2005). Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 8357–8362.
208. Bale, T. L., Contarino, A., Smith, G. W., Chan, R., Gold, L. H., Sawchenko, P. E., Koob, G. F., Vale, W. W., and Lee, K. F. (2000). Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. Nat. Genet. 24, 410–414.
209. Mantella, R. C., Vollmer, R. R., Li, X., and Amico, J. A. (2003). Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. Endocrinology 144, 2291–2296.
210. File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., and Lippa, M. T. (2004). Animal tests of anxiety. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 8, Unit 8.3.
211. Crawley, J., and Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacol. Biochem. Behav. 13, 167–170.
212. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J. Neurosci. Methods 14, 149–167.
213. Malick, J. B. (1978). Selective antagonism of isolation-induced aggression in mice by diazepam following chronic administration. Pharmacol. Biochem. Behav. 8, 497–499.
214. Wongwitdecha, N., and Marsden, C. A. (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. Behav. Brain Res. 75, 27–32.

215. Kudryavtseva, N. N., and Bondar, N. P. (2002). Anxiolytic and anxiogenic effects of diazepam in male mice with different experience of aggression. Bull. Exp. Biol. Med. 133, 372–376.
216. DiMascio, A. (1973). The effects of benzodiazepines on aggression: reduced or increased? Psychopharmacologia 30, 95–102.
217. Bond, A. J., Curran, H. V., Bruce, M. S., O'Sullivan, G., and Shine, P. (1995). Behavioural aggression in panic disorder after 8 weeks' treatment with alprazolam. J. Affect. Disord. 35, 117–123.
218. Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. Prog. Neurobiol. 70, 83–244.
219. de Almeida, R. M., Ferrari, P. F., Parmigiani, S., and Miczek, K. A. (2005). Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. Eur. J. Pharmacol. 526, 51–64.
220. Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests, 1-20.
221. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of neuroscience methods, 14(3), 149-167.
222. Wang F, Zhu J, Zhu H, Zhang Q, Lin Z, Hu H. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. Science. 2011;334(6056):693–7. doi: 10.1126/science.1209951
223. Spencer CM, Alekseyenko O, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R. Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. Genes Brain Behav. 2005;4:420–430.
224. Eikelboom R, Hrelja S. Running in male rats: varying night length. Abstract #520.3. Society for Neuroscience meeting; New Orleans (LA).
225. Eikelboom R, Mills R. A microanalysis of wheel running in male and female rats. Physiol Behav 1988;43:625 – 30.
226. Looy H, Eikelboom R. Wheel running, food intake, and body weight in male rats. Physiol Behav 1989;45:403 – 5.
227. Mueller DT, Herman G, Eikelboom R. Effects of short- and long-term wheel deprivation on running. Physiol Behav 1999;66:101 – 7.

228. Mueller DT, Loft A, Eikelboom R. Alternate-day wheel access: effects on feeding, body weight, and running. Physiol Behav 1997;62:905 – 8.
229. Belke TW, Heyman GM. A matching law analysis of the reinforcing efficacy of wheel running in rats. Anim Learn Behav 1994;22:267 – 74.
230. Iverson IH. Techniques for establishing schedules with wheel running as reinforcement in rats. J Exp Anal Behav 1993;60:219 – 38.
231. Kagan J, Berkun M. The reward value of running activity. J Comp Physiol Psych 1954;47:108
232. Lett BT, Grant VL, Byrne MJ, Koh MT. Pairing of a distinctive chamber with the after effect of wheel running produce conditioned place preference. Appetite 2000;34:87 – 94.
233. Lett BT, Grant VL, Koh MT. Naloxone attenuates the conditioned place preference induced by wheel running in rats. Physiol Behav 2001;72:355 – 8.
234. Antoniadis EA, Ko CH, Ralph MR, McDonald RJ. Circadian rhythms, aging and memory. Behav Brain Res 2000;114:221 – 33.
235. Eikelboom R. Bins, bouts and wheel running speed. Anim Behav 2001;61:681 – 97.
236. Brody EG. Genetic basis of spontaneous activity in the albino rat. Comp Psych Mongr 1942;17:24.
237. Koteja P, Swallow JG, Carter PA, Garland Jr T. Energy cost of wheel running in house mice: implications for coadaptation of locomotion and energy budgets. Physiol Biochem Zool 1999;72:238 – 49.
238. Rundquist EA. Inheritance of spontaneous activity in rats. J Comp Psychol 1933;16:415 – 38.
239. Swallow JG, Garland Jr T, Carter PA, Zhan W, Sieck GC. Effects of voluntary activity and genetic selection on aerobic capacity in house mice. J Appl Physiol 1988;84:69 – 76.
240. Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izidio GS. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. 2008 Nov 21;193(2):277-88.
241. Bertoglio, L.J., Anzini, C., Lino-de-Oliveira, C., Carobrez, A.P., 2005. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. Behav. Brain Res. 162, 99–107.

242. Escarabajal, M.D., Torres, C., Flaherty, C.F., 2003. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. Life Sci. 73, 1063–1074.
243. Rodgers, R.J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci. Biobehav. Rev. 21, 801–810.
244. Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A., 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Braz. J. Med. Biol. Res. 30, 289–304.
245. Belzung, C., 1999. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.), Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Elsevier, Amsterdam, pp. 738–749.
246. Hogg, S., 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol. Biochem. Behav. 54, 21–30.
247. A.P. Carobreza, L.J. Bertogliob. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 29 (2005) 1193–1205.