

**ERIKOISREHUN KOOSTUMUKSEN VAIKUTUS
MUUNTOGEEENISEN HIIRIKANNAN LISÄÄNTYMISEEN**

Jenni Niiranen
Pro gradu-tutkielma
Soveltava biotekniikka/Molekyylibiologia ja geeniteknologia
Kuopion yliopisto Biotieteiden laitos
Elokuu 2008

TIIVISTELMÄ

KUOPION YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta
Soveltavan biotekniikan koulutusohjelma, molekyylibiologian ja geeniteknologian pääaine
Jenni Niiranen: Erikoisrehun koostumuksen vaikutus muuntogeenisen hiirikannan lisääntymiseen
Opinnäytetutkielma 44 sivua
Opinnäytetutkielman ohjaajat: dosentti Maria Halmekytö, FT Satu Mering, dosentti Eila Kaliste
Elokuu 2008

Avainsanat: *muuntogeenisyys, sisäsiittoisuus, hiiri, lisääntymisongelmat, ravitseminen, rehu*

Erialaisten geenimuunneltujen ja sisäsiittoisten hiirikantojen määrän lisääntyessä sisäsiittoisuus ja geenimuuntelu aiheuttavat mahdollisesti lisääntymisongelmia laboratoriohiirten tuotannossa. Ongelmat hiirten lisääntymisessä nostavat tutkimuksen kuluja, kun tutkimukseen tarvittu hiirimäärän tuottaminen ja ylläpito kestävät kauan. Yksi tapa edistää hiirten lisääntymistä voisi olla erityisesti lisääntymiseen kehitetyn rehun käyttö.

Tässä tutkimuksessa vertailtiin kaupallisen erikoissiitosrehun Transbreed (SDS) ja tavallisen siitos- ja ylläpitorehun R3 (R3) koostumuksen vaikutuksia muuntogeenisten ja sisäsiittoisten hiirien poikastuotantoon. Tutkimuksessa käytettiin muuntogeenisiä hiirikantoja APPswe ja APPswe/PS1dE9 sekä sisäsiittoista C57BL/6J -kantaa. Hiiret söivät sekä R3- että SDS -rehuja perättäisinä jaksoina, joiden aikana syntyneet poikueet ja poikaset laskettiin. Poikaset punnittiin vierotuksessa.

SDS -rehu ei lisännyt syntyneiden poikueiden tai poikasten määrää millään kannalla, mutta poikaset kasvoivat normaalia nopeammin vierotuspainoisiksi ja olivat elinvoimaisempia. Nopeampi kasvu saattoi johtua siitä, että autoklavoitu SDS -rehu on autoklavoitua R3 -rehua ilmavampaa ja näin ollen se murenee helpommin poikasten syötäväksi. Lisäksi SDS -rehun rasvapitoisuus on R3 -rehua huomattavasti suurempi. Rehun rasvaisuus on voinut lisätä emon maidon ravitsevuutta ja näin ollen saada poikaset kasvamaan normaalia nopeammin. Nopeampi kasvu saattaa johtua siitä, että autoklavoitu SDS -rehu on autoklavoitua R3 -rehua helpommin poikasten syötävissä. Hiirten lisääntymiseen vaikuttavat monet muutkin asiat kuin rehu, esimerkiksi ympäristökijät ja paritusstrategiat. Nämä saattavat olla osasyynä huonoon lisääntymiseen.

ESIPUHE

Tämä tutkimus toteutettiin Valtakunnallisen koe-eläinkeskuksen (VKEK) barrierissa loppuvuodesta 2006 vuoden 2007 alkusyksyyn. Tuona aikana opin tuhat ja yksi asiaa hiiristä ja niiden lisääntymisestä, mutta ennen kaikkea tämän tutkimuksen aikana minulle on tullut selväksi se tosiasia, että hiiri on elävä olento ja kokonaisuus, mikä tekee hiiren tieteellisestä tutkimisesta haasteellista. Kaikki hiiret ovat yksilöitä, ja niiden poikastuotantoon vaikuttavat ravinnon lisäksi muut hiiret ja elinympäristö, jotka taas vaikuttavat hiirten hyvinvointiin. Kun soppaan lisätään vielä geenimuunnoksia, saadaan hyvin laaja-alainen ja toisinaan vaikeaselkoinenkin keitos.

Tämä tutkimus ei olisikaan onnistunut ilman asiantuntevien koe-eläinalan ammattilaisten apua. Haluan kiittää VKEK:n barrierin henkilökuntaa, joka uhrasi työaikaansa opettaakseen minulle kädestä pitäen hiirten hoidon, parituksen ja poikasten vierotuksen kommervenkit. Erityiskiitoksen ansaitsee myös professori Heikki Tanila, joka lainasi minulle geenimuunneltuja siitoshiiriään tutkimuksen ajaksi.

Kiitän myös FT Satu Meringiä, joka laati tutkimussuunnitelman ja antoi minulle neuvoja tutkimuksen edetessä. Käytännön työn päätteeksi pitää osata laskea tuloksia, ja siinä korvaamattomana apuna oli dosentti Eila Kaliste. Hän on neuvonut ja kannustanut minua koko kirjoitusprosessin ajan, ja ilman hänen apuaan olisin ollut todella pahassa pulassa graduineni.

Lisäkiitos myös dosentti Maria Halmekydölle, joka kyllä varoitti minua hiirten lisääntymisen tutkimisen hankaluudesta. Hän on antanut rautaisella ammattitaidolla neuvoja ja ohjeita koko prosessin ajan. Kiitos myös Liisa Nurmiselle, joka lupautui tarkastajaksi kun aika oli jo kortilla.

Suurin kiitos kuuluu kuitenkin miehelleni Jannelle, joka on jaksanut tukea minua koko tämän pitkän prosessin ajan ja kuunnellut kiukutteluani kun työskentely ei olekaan sujunut ihan niin rattaosasti. Nyt vihdoinkin olemme lomamme ansainneet!

Kuopiossa elokuussa 2008

Jenni Niiranen

LYHENNELUETTELO

APP	APPswe -hiirikanta
ApdE9	APPswe/PS1dE9 -hiirikanta
B6	C57BL/6J -hiirikanta
GLM	Yleinen lineaarinen malli (<i>General Linear Model</i>)
IE	kansainvälinen yksikkö (<i>International Einheit</i>)
ME	Muuntokelpoinen energia
R3	Siitos- ja ylläpitorehu, Lantmännen, Ruotsi
SDS	TransBreed-erikoisrehu, SDS, UK
SPF	Tietyistä patogeeneista vapaa (<i>Specific Patogen Free</i>)
VKEK	Valtakunnallinen koe-eläin keskus

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	7
2. KIRJALLISUUSKATSAUS.....	8
2.1. Hiiret koe-eläiminä.....	8
2.1.1 Sisäsiittoiset hiirikannat.....	8
2.1.2 Geenimuunnellut hiirikannat.....	9
2.1.3 Geenimuunneltujen hiirikantojen luominen.....	9
2.2. Hiiren lisääntymiseen vaikuttavia tekijöitä.....	11
2.2.1 Hiirillä yleisesti käytettyjä paritusstrategioita.....	12
2.2.2 Ympäristöolosuhteiden vaikutus hiirten lisääntymiseen.....	13
2.3. Hiirten ravinto.....	14
2.3.1 Ravinnon vaikutus hiirten lisääntymiseen.....	15
2.3.2 Rehujen koostumus ja käyttö.....	15
2.3.3 Rehun koostumuksen ja perimän vaikutukset hiirten hyvinvointiin ja lisääntymiseen.....	16
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	18
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	19
4.1. Eläimet ja niiden ylläpito.....	19
4.2. Tutkimuksen aikana tehdyt mittaukset.....	21
4.3. Ruokinta.....	21
4.4. Poikastuotannon, rehunkulutuksen ja hiirten painon seurannan toteutus.....	24
4.5. Tulosten käsittely.....	24
5. TULOKSET.....	25
5.1. Syntyneiden poikueiden ja poikasten määrät.....	25
5.2. Rehun vaikutus poikasten vierotusikään.....	28
5.3. Poikasten vierotuspainot.....	30
6. POHDINTA.....	33
6.1. Rehun vaikutus syntyneiden poikueiden ja poikasten lukumääriin.....	33
6.2. Rehun vaikutus poikasten vierotusikään ja -painoon.....	34
6.3. Rehun koostumuksen vaikutus poikasten kehitykseen.....	35
6.4. Paritusstrategian vaikutus lisääntymiseen.....	37
6.5. Ympäristötekijöiden vaikutukset muuntogeenisten hiirten fenotyyppiin.....	39
6.6. Muita mahdollisuuksia parantaa hiirten lisääntymistä.....	39
7. LÄHTEET.....	41

1. JOHDANTO

Erilaisten geenimuunneltujen hiirikantojen määrä lisääntyy koko ajan (Simpson ym. 1997). Muuntogeenisiä hiirikantoja käytetään runsaasti muun muassa ihmisten tautien malleina ja geenien toiminnan tutkimisessa. Jotkut muuntogeeniset hiirikannat kuitenkin lisääntyvät huonosti (Simpson 1998; van der Meer ym. 2001; de Boer ym. 2002; Hedrich 2006; Tsai ym. 2005), jolloin tutkimukseen riittävän hiirimäärän tuottaminen voi kestää kauan. Hidas lisääntyminen voi johtua muun muassa monista ympäristötekijöistä (Marchlewska-Koj 1997), mutta todennäköisesti sekä muuntogeenisten hiirikantojen sisäsiittoinen tausta että geenimuunnos aiheuttavat joillekin muuntogeenisille hiirikannoille lisääntymisongelmia (Silver 1995; van der Meer ym. 2001; Hedrich 2006).

Tässä tutkimuksessa hiirten lisääntymisellä tarkoitetaan ajanjaksoa, joka alkaa hiirten puberteetista johtaen naarashiirten tiinehtymiseen. Ajanjakso päättyy syntyneiden poikasten vierottamiseen. Parantamalla hiirten lisääntymiskykyä saataisiin tutkimukseen tarvittava määrä muuntogeenisiä hiiriä nopeammin. Tässä tutkimuksessa lisääntymiskyvyllä tarkoitetaan kunkin naaraan elinikäistä poikas- ja poikuetuotantoa. Yksi tapa lähestyä hiirten lisääntymisongelmia on vaikuttaa hiirten ravitsemukseen. Tässä tutkimuksessa lisääntymisongelmiksi luetaan suuri poikaskuolleisuus, pienet poikuekoot ja pienet vierotettujen poikasten määrät kutakin naarasta kohden.

Tiedetään, että oikea rasvan ja proteiinien suhde on parhaan mahdollisen lisääntymistuloksen kannalta tärkeää (Knapka ym. 1977), ja että tietyt hivenaineet, kuten magnesium voivat jo kantoaikana vaikuttaa merkittävästi poikastuotantoon (Hurley ym 1976). Tässä tutkimuksessa lisääntymistuloksella tarkoitetaan syntyneiden ja vierotettujen poikasten ja poikueiden määriä kutakin naarasta kohden. Hiirille on kehitetty monia erilaisia erikoisruokavalioita, myös lisääntymisen erityistarpeita varten. Tässä tutkimuksessa tutkittiin SDS:n TransBreedTM -erikoisrehun vaikutusta muuntogeenisten ja sisäsiittoisten hiirikantojen lisääntymistulokseen, ja verrattiin tämän erikoisrehun vaikutusta Valtakunnallisessa koe-eläinkeskuksessa tavallisesti käytetyllä R3 -siitos- ja ylläpitorehulla saavutettuun poikastuotantoon.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. Hiiret koe-eläiminä

Tautien tai ympäristöolojen vaikutuksia yksilöön on helpompi tutkia koe-eläimillä kuin ihmisillä, sillä ihmisten elämässä on paljon sellaisia muuttujia, joita ei voida kontrolloida (Hedrich 2006). Koe-eläiminä käytettyjen jysijöiden perimä ja ympäristöolot voidaan vakiinnuttaa, koska ne ovat helposti kontrolloitavissa. Tällöin erot yksittäisten hiirten perimässä tai muutokset ympäristöoloissa eivät häiritse tulosten tulkintaa. Yleisin koe-eläin on hiiri. Se on pieni, halpa, helppohoitoinen ja se lisääntyy nopeasti. Lisäksi hiiren genomi tunnetaan tarkasti (Waterston ym. 2002) ja geeninsiirtotekniikat toimivat hiirillä hyvin, joten hiirestä on tullut eräs genetiikan tärkeimmistä mallieläimistä (Hedrich 2006).

2.1.1 Sisäsiittoiset hiirikannat

Sisäsiittoinen hiirikanta luodaan parittamalla sisaruksia keskenään (Green 1981, Silverin 1995 mukaan). Toistamalla näitä sisäsiittoisia parituksia vähintään 20 sukupolven ajan saadaan hiiriä, joiden perimät ovat lähes sataprosenttisesti identtisiä. Näin geneettisten erojen aiheuttama vaihtelu ja mahdollinen harha kokeiden tuloksissa on hyvin pieni (Hedrich 2006). Vähäisempi hajonta tarkoittaa luotettavampia tuloksia ja pienempää kokeisiin tarvittavaa eläinmäärää. Lisäksi sisäsiittoisia kantoja on tutkittu paljon, joten kunkin kannan ominaisuudet tunnetaan hyvin.

Sisäsiitostus johtaa kaikkien geenien suhteen alleelien homotsygotiaan (Silver 1995), jolloin vain yksi kunkin geenin alleeleista jää jäljelle. Tällaiset geneettiset muutokset voivat osaltaan vaikuttaa sisäsiittoisten kantojen heikkoon lisääntymistulokseen. Perimän kaventuminen ja perimään mahdollisesti jääneiden lisääntymiseen huonontavasti vaikuttavien geenialleelien homotsygotia lisäävät kehityshäiriöiden mahdollisuutta ja saattavat aiheuttaa lisääntymisongelmia. Ulkosiitoksessa jatkuva

haitallisten alleelien eliminaatio ja uusien alleelien ilmaantuminen populaatioon estävät haitallisten alleelien ilmenemisen lisääntymistä populaatiossa. Ulkosiittoisiin kantoihin verrattuna sisäsiittoiset hiiret ovat selkeästi elinvoimaltaan heikompia ja ne lisääntyvät huonommin, mikä näkyy pienempinä poikueina, harvempina synnytyksinä, ja lyhyempänä siitostusikänä, sekä suurempana herkkyytenä ympäristön häiriöille lisääntymistuloksessa (Silver 1995; Hedrich 2006).

2.1.2 Geenimuunnellut hiirikannat

Muuntogeenisiä hiiriä käytetään paljon geenien ominaisuuksien ja toiminnan tutkimiseen (Hedrich 2006). Hiiren koko genomi tunnetaan ja hiiren genomia käytetäänkin usein vertailukohtana muiden lajien genomeihin (Waterston ym. 2002). Vertailua tehdään etenkin ihmisen genomiin, sillä ihmisen ja hiiren genomit ovat 99 % samanlaiset (Waterston ym. 2002; Hedrich 2006). Lisäksi eräät geeninsiirtotekniikat onnistuvat ainoastaan hiirillä, koska toistaiseksi ainoastaan tiettyjen sisäsiittoisten kantojen pluripotentteja kantasoluja voidaan kasvattaa *in vitro*.

Ajan myötä laboratoriohiiristä on kehitetty useita ihmisen tautien malleja hyödyntämällä spontaaneja mutaatioita (Hedrich 2006). Ihmisen tautigeeni voidaan myös helposti siirtää muuntogeeniseen hiireen ja sitä kautta saada aikaan ihmisen tautitilaa muistuttava malli hiiressä. Muuntogeenisiä hiiriä voidaan siis käyttää ihmisten perinnöllisten tautien malleina, ja niiden avulla voidaan myös kokeilla mahdollisia hoitoja tauteihin (Crawley & Paylor 1997; Contet ym. 2001; Vloeberghs ym. 2004).

2.1.3 Geenimuunneltujen hiirikantojen luominen

Hiiren alkion pluripotenttien kantasolujen perimää voidaan muokata monin eri tavoin, ja kantasolut säilyttävät kykynsä osallistua ituradan luomiseen vielä senkin jälkeen, kun ne on siirretty osaksi kehittyvää alkioita (Hedrich 2006). Yleisimmin muuntogeeninen hiirikanta luodaankin siirtämällä hiiren blastokystivaiheen alkioon geenimuunneltuja

alkion kantasoluja (Smithies 1993; Silver 1995). Geeninsiirtoa varten rakennetaan kohdennusvektori, jolla muokattu DNA siirretään alkion kantasolujen genomiin, jotka sitten siirretään osaksi kehittyvää alkiota. Näin hiireen tehdyllä kohdennetulla geeninsiirrolla voidaan periaatteessa modifioida mitä tahansa geenii. (Capecchi 1989). Toinen yleinen geeninsiirtotapa on mikroinjektio, jossa muokattua geeniaainesta siirretään yhteen hedelmöityneen munasolun esitumista (Gordon ym. 1980).

Syntyneiden poikasten siirtogeenisyys analysoidaan joko PCR -tai Southern blot -tekniikoilla (Gordon ym. 1980; Hedrich 2006) ja siirtogeeniset F1 -polven hiiret paritetaan keskenään, jotta F2 -polvesta saataisiin siirtogeenin suhteen homotsygootteja yksilöitä. Mikäli geenimuunnos periytyy jälkeläisille, voidaan näistä luoda uusi muuntogeeninen kanta. Tavallinen tapa vakioda eläinten taustaperimä on takaisinristeyttää muuntogeeniset hiiret vähintään kymmenen sukupolven ajan sisäsiittoiseen hiirikantaan. Näin saadaan kongeeninen kanta, joka eroaa tavallisesta sisäsiittoisesta kannasta ainoastaan yhden, muunnetun geenin suhteen (Contet ym. 2001; Hedrich 2006). Tällöin muuntogeenin vaikutukset fenotyyppiin on helppo erottaa sisäsiittoisesta taustasta ja tutkia muuntogeenin vaikutusta esimerkiksi hiirien hyvinvointiin ja käyttäytymiseen (Silver 1995). Kontrolleina voidaan käyttää normaaleja sisäsiittoisia hiiriä. Kanta voidaan ylläpitää joko hetero- tai homotsygoottisena.

Kun tutkimuksissa käytetään muuntogeenisiä eläimiä, ovat eläinmäärät usein vähäisiä. Tämä voi johtua joidenkin muuntogeenisten hiirikantojen pienistä poikueista ja poikasten huomattavasta kuolleisuudesta (Nagai ym. 1993; Coluccia ym. 2004). Yksi syy lisääntymisongelmiin voi olla se, että takaisinristeytykseen käytetty sisäsiittoinen hiirikanta saattaa olla huonosti lisääntyvä. Mikäli geenimuunnos vaikuttaa negatiivisesti lisääntymiseen, lisää tämä entisestään sisäsiittoisuudesta johtuvaa huonompaa jälkeläistuotantoa (Hedrich 2006). Tässä tilanteessa kolonian kasvattaminen tarpeeksi suureksi, jotta tutkimuksen tarpeisiin saadaan riittävästi koe-eläimiä, on hidasta.

2.2. Hiiren lisääntymiseen vaikuttavia tekijöitä

Hiirten lisääntymistehoa voidaan mitata useiden eri parametrien avulla (Silver 1995). Tällaisia parametreja ovat naaraan ikä ensimmäisessä parituksessa, syntyneiden poikasten määrä, poikasten määrä poikuetta kohden sekä onnistuneiden parituksien määrä. Näiden parametrien välillä on suuria kantakohtaisia eroja etenkin sisäsiittoisten kantojen välillä. Joillain hiirikannoilla keskimäärin 90 % parituksista onnistuu, kun esimerkiksi BALB/cJ -hiirikannan parituksista onnistuu vain 50 %. Myös keskimääräinen poikuekoko voi kantakohtaisesti vaihdella 9,5 ja 5,2 poikasen välillä.

Kantoaika hiirinaaraalla joka ei imetä on noin 19-21 päivää, kannasta riippuen (Poole 1999). Valeraskaudet, joita hiirillä myös toisinaan ilmenee, kestävät 10-13 päivää. Hiirinaaras synnyttää 1-14 poikasta, mutta keskimääräinen poikuekoko on 6-8 poikasta ja naaraan elinikäinen poikastuotanto on noin 4-8 poikuetta. Hiiren syntymäpaino on vain noin 1 grammaa, kun se vierotusiässä noin kolmeviikkoisena on jopa 8-12 grammaa. Synnytysten väli on 3,5-6 viikkoa jatkuvassa parituksessa (Poole 1987, O'Brienin ja Holmesin 1993 mukaan), ja hiiri lisääntyy laboratorio-oloissa vuoden ympäri (Hedrich 2006). Naaraan hedelmällisyys heikkenee sen synnyttämien poikueiden määrän kasvaessa (Silver 1995). Kantakohtaiset erot ja ympäristöolot vaikuttavat kuitenkin suuresti siihen, miten monta poikuetta ja poikasta naaralle syntyy. Ikääntymisen myötä poikuekoko pienenee (Silver 1995), mutta poikuekoko voi myös kasvaa siihen saakka, kunnes emo on noin kaksivuotias (Poole 1999), eli kunnes emo on jo varsin iäkäs, sillä hiiren keskimääräinen elinikä on vain 1-3 vuotta (Silver 1995). Uroksen hedelmällisyyteen ikääntymisellä ei ole merkittävää vaikutusta.

Poikaset kasvavat ensimmäisten 6-8 viikon ajan nopeasti (Poole 1999). Kasvu jatkuu hitaampana puolivuotiaaksi saakka, minkä jälkeen seuraa muutaman kuukauden tasainen vaihe, jolloin hiiret eivät kasva. Tämän jälkeen hiirten paino alkaa laskea. Emon kyky hoitaa poikasiaan voi vaikuttaa jopa 70 % poikasten painonvaihteluihin. Naaraspoikaset saavuttavat sukukypsyyden jopa 24-28 päivää syntymästään. Urosten puberteetti alkaa noin kaksi viikkoa myöhemmin.

2.2.1 Hiirillä yleisesti käytettyjä paritusstrategioita

Paras mahdollinen paritusstrategia riippuu käytetystä hiirikannasta (Whitaker ym. 2007). Jotkut tutkijat uskovat, että haaremiparitus (yksi uros ja kaksi tai useampi naarasta) auttaa geenimuunneltuja hiirikantoja ja hitaasti lisääntyviä kantoja tuottamaan enemmän poikasia, sillä kun lisääntyviä naaraita on häkissä useampi kuin yksi, voivat naaraat imettää toistensa poikasia ja kokeneemmat naaraat auttaa ensisynnyttäjiä poikasten hoidossa. Toisaalta naaraiden välisen vuorovaikutuksen on havaittu aiheuttavan valeraskauksia (Marchlewska-Koj ym. 1994) ja tappeluita (Hedrich 2006).

Kun häkissä on vain yksi naaras, on havaittu, että poikasia vierotetaan naarasta kohden enemmän, kuin jos häkissä olisi useita naaraita (Eskola & Kaliste-Korhonen, 1999). Toisaalta, kun häkissä on kaksi tai useampi naarasta, vierotettujen poikasten häkkikohtainen määrä on suurempi. On myös osoitettu, että kaikkein taloudellisin vaihtoehto on pitää kaksi naarasta häkissä urosta kohden. Tällöin tarvittava tila ja materiaalikustannukset ovat pienemmät, kuin jos kaikissa häkeissä olisi vain yksi naaras. Enempää naaraita ei tarvita, sillä kolmas naaras ei enää parantanut häkkikohtaista tuotosta.

Paritusstrategiaa valitessa tulee ottaa huomioon myös se, antaako uroksen olla häkissä myös silloin, kun naaras on kantavana tai kun naaraalla on poikaset. Kahdenkymmenen kahdeksan tunnin sisällä synnytyksestä naaras tulee niin sanottuun post partum -kiimaan, johon astuttuna se voi tulla uudelleen kantavaksi (Silver 1995), ja siksi uroksen jatkuva läsnäolo häkissä voi olla lisääntymisen kannalta hyvä asia. Kuitenkin, jos uros on koko ajan häkissä ja naaras tulee kantavaksi vielä imettäessään edellistä poikuettaan, naaraan implantaatio myöhästyy, jolloin synnytys tapahtuu muutaman päivän keskimääräistä myöhemmin (Grüneberg 1943, Silverin 1995 mukaan). Kantavana ollessaan naaraat myös syövät edellisten poikueiden poikasia, etenkin juuri ennen synnytystä (McCarthy & vom Saal 1985), jolloin jatkuva paritus ei välttämättä ole paras mahdollinen lisääntymisstrategia.

Jos häkissä on useita naaraita ja yksi uros, voidaan kantavat naaraat ottaa häkistä pois kanto- ja imetysajaksi, jolloin uroksen ja toisten naaraitten läsnäolo ei haittaa naaraan

pesärauhaa. Toisaalta ensisynnyttäjä hylkää poikueensa todennäköisemmin kuin emo, joka on synnyttänyt jo useita poikueita (Poole 1999), joten jos häkissä on useita naaraita, voivat vanhemmat emot opastaa ja auttaa nuorempia emoja poikasten hoidossa (Whitaker ym. 2007).

2.2.2 Ympäristöolosuhteiden vaikutus hiirten lisääntymiseen

Monet aistivälitteiset ympäristön tekijät, kuten valo, ääni, lämpötila, hajut ja kosketus vaikuttavat hiirten sisäeritysjärjestelmään, esimerkiksi lisääntymishormonien eritykseen ja toimintaan ja sitä kautta sukupuoliseen käyttäytymiseen ja lisääntymistoimintoihin (Marchlewska-Koj 1997). Kovat, varsinkin korkeataajuuksiset äänet aiheuttavat laboratorioeläimille stressiä (Anthony ym. 1959). Kova ääni myös heikentää naaraiden hedelmällisyyttä (Nawrot ym. 1980). Emot myös syövät poikasensa normaalia useammin kovan äänen aiheuttamassa stressissä (Poole 1999). Myös usein toistuva tai pitkäkestoinen käsittely saattaa aiheuttaa keskenmenoja hiiriemolle (Wiebold ym. 1986). Kantoaikana stressattujen rottaemojen poikueet käyttäytyivät normaalia pelokkaammin, mikä saattaa vaikuttaa tiettyjen käyttäytymiskokeiden tuloksiin (Poltyrev ym. 1996). Myös muut samassa häkissä olevat hiiret ovat toisilleen ympäristötekijöitä, sillä esimerkiksi poikueen koko vaikuttaa yksittäisten poikasten kehitykseen. Toyohito Tanaka on poikuekokoa tutkiessaan havainnut, että pienten poikueiden poikaset kasvavat imetyksen aikana nopeammin, kuin suurten poikueiden poikaset. Ero voi johtua suurten poikueiden aliravitsemuksesta (Tanaka 1998).

Hiirten lisääntymistä haittaa myös liian tiheä ryhmä (Chapman ym. 1998). Naarilla ilmenee aggressiivista käyttäytymistä muita naaraita ja näiden poikasia kohtaan, kun häkissä oli yksi uros ja useita naaraita. Naaraiden keskinäisen kilpailun ja aggressiivisuuden uskotaankin olevan tärkeä tekijä hiiriyhteisön populaatiokoon kontrolloinnissa (Chovnik ym. 1987, Chapmanin ym. 1998 mukaan).

2.3. Hiirten ravinto

Hiiret ovat luonnostaan omnivoreja eli kaikkiruokaisia. Niille kelpaavat siemenet, viljat, kasvien osat sekä eläinperäiset tuotteet (National Research Council ym. 1995), eivätkä niiden ravitsemustarpeet yleisesti ottaen ole erityisen spesifisiä (Troelson & Bell 1963). Hiiri syö 21 päivää vierotuksen jälkeen päivittäin keskimäärin 3,75g kuivaa ravintoa, hiiren saadessa grammasta rehua 3,9 kcal muuntokelpoista energiaa (ME) (Calvert ym. 1986 National Research Council ym. 1995 mukaan). Kasvavan hiiren ravinnontarpeen 21-42 päivän iässä arvioidaan olevan noin 263 kcal ME painokiloa kohden (National Research Council ym.1995). Arviot kuitenkin vaihtelevat suuresti tutkimuksesta, käytetyistä kannoista ja laskutavasta riippuen. Ensimmäisinä elinpäivinä poikasen kasvu riippuu emolta saadun maidon määrästä ja laadusta. Poikaset alkavat syödä kiinteää ravintoa 11-12 päivän iässä (Poole 1999). Kasvava tai kantava sekä imettävä hiiri tarvitsevat enemmän energiaa kuin tutkimuskäytössä oleva aikuinen hiiri (Poole 1999; Hedrich 2006).

Hiiren ravinnontarpeen tarkka arvioiminen onkin vaikeaa, koska hiirikantojen väliset geneettiset erot aiheuttavat eroja ravintovaatimuksissa, ja yksilöiden ravinnontarve muuttuu hiirten käyttötarkoituksen mukaan (National Research Council ym. 1995). Varsinkin kasvavan hiiren ravinnontarvetta on hyvin vaikea määrittää. Hiirten ravinnontarve vaihtelee myös niiden ikäkausien mukaan. Myös hiirten elinympäristö vaikuttaa ravinnontarpeeseen laboratorio-oloissa. Barrierissa elävien hiirten suoliston bakteerikanta on erilainen kuin konventionaalitiloissa elävillä hiirillä, koska barrierioloissa hiiret eivät saa ympäristöstään yhtä paljon erilaisia mikrobeja elimistöönsä kuin konventionaalitiloissa, jolloin niiden ravinnontarpeetkin voivat erota konventionaalioloissa elävien hiirten tarpeista.

Ylläpidossa oleville (kuten kokeissa käytettävät) ja siitoksessa oleville hiirille annetaan usein eri rehua, koska rasvainen lisääntymisrehu voi lihottaa koehiiriä, kun taas ylläpitorehu voi aiheuttaa aliravitsemusta imettäville ja kantaville naaraille (Poole 1999). Ravintoaineista proteiinit ovat kasvun kannalta hiilihydraattien saantia tärkeämpiä (Bosshardt ym. 1948). Hiiret kuitenkin tarvitsevat kuituja suolistonsa hyvinvoinnin ylläpitämiseen, ja kuituja hiiret saavat nimenomaan tietyistä hiilihydraateista. Rasvaprosenttia viisi suositellaan ylläpidossa oleville hiirille mutta jotkin kannat voivat

tarvita enemmänkin rasvaa kasvuun ja lisääntymiseen (National Research Council ym. 1995).

2.3.1 Ravinnon vaikutus hiirten lisääntymiseen

Ravintoaineiden oikeat määrät ja niiden väliset suhteet ovat hiirten ravitsemuksen kannalta tärkeitä. Lisääntymisen kannalta tärkeintä taas on rasvan ja proteiinien sopiva suhde, eli proteiinia tulisi olla alle 18 % ja rasvaa 10-11 % (Knapka ym. 1977). Myös jotkin hivenaineet ja vitamiinit ovat hiirten hyvinvoinnille välttämättömiä. Esimerkiksi magnesiumin riittävä saanti on tärkeää raskauden ja imetyksen aikana (Hurley ym 1976).

Rogersin tutkimusryhmä mittasi kokeessaan CD-1 hiiriemojen ravinnontarvetta kantoaikana (Rogers ym. 2003). Heidän mukaansa emot söivät kantopäivinä 4-7 noin 5,2 g rehua. Kantopäivästä 8 eteenpäin ravinnon kulutus kasvoi tasaisesti ja kantopäivänä 17 emot söivät keskimäärin 11,0 g rehua. Kun naaraat saivat syödäkseen alle 50 % edellä mainitusta rehun keskikulutuksesta, ei ravinnosta saatu energia enää riittänyt ylläpitämään normaalia tiineyttä. Kun rehua annettiin 50 % keskiarvosta, tiineydet jatkuivat normaalisti synnytykseen saakka, mutta emojen ja syntyneiden poikasten painot jäivät alhaisiksi. Aliravittujen naaraitten alhainen paino ei kuitenkaan vaikuttanut naaraitten hedelmällisyyteen.

Myös poikuekoko vaikuttaa emon ravinnontarpeeseen ja kykyyn ruokkia poikasiaan riittävästi. Suurissa poikueissa poikaset ovat vielä 11 kuukauden vanhoina pienempiä kuin pienemmissä poikueissa. Jos emo on aliravittu mutta poikaset saavat syntymän jälkeen normaalisti ravintoa, ei kantoajan aliravitsemus vaikuta poikasten kasvuun.

2.3.2 Rehujen koostumus ja käyttö

Teollisesti tuotetut rehut ovat yleensä koostumukseltaan tasalaatuisia niin sanottuihin luonnonrehuihin verrattuna (National Research Council ym. 1995). Tasalaatuisen

koostumuksen ansiosta hiiret saavat aina kaikki tarvitsemansa ravintoaineet sopivissa mittasuhteissa päivittäisestä ruokavaliostaan. Teollisia perusrehuja kalliimpia ovat niin sanotut puhdistetut erikoisrehut, joista on poistettu kaikki ylimääräiset komponentit. Tutkimuskäyttöönkin voidaan kehittää erikoisrehuja, joiden avulla tutkitaan jotain tiettyä ravitsemuksen osa-aluetta. Esimerkiksi lihavuutta, rasva-aineenvaihduntaa tai geenien ja hormonien toimintaa voidaan tutkia rehuilla, joiden rasvapitoisuus on normaalia huomattavasti suurempi (Zorrilla ym. 2007).

Ravitsemustutkimuksissa hiirten kuluttaman rehun määrää tarkkaillaan tavallisimmin mittaamalla annetun ja kulutetun rehun määrä ja laskemalla niiden välinen erotus (National Research Council ym. 1995). Mittausta hankaloittaa se, ettei kaikki häkin ruokintakaukalosta poistunut rehu ole välttämättä tullut syödyksi. Hiiret saavat helposti ujutettua rehupellettejä ruokintakaukalosta häkin pohjalle. Siksi myös häkkien pohjat tulee tarkastaa tutkimuksen aikana, jotta kaikki ylijäänyt rehu voidaan punnita eikä mittausrvirhettä tapahdu.

Rehut tulee säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa. SPF-barrierissa (tietystä patogeneista vapaa barrieri) pidettäville hiirille rehut on steriloitava esimerkiksi autoklavoimalla. Rehujen tarkka säilytys ja riittävän usein tapahtuva puhtaan rehun vaihto häkkeihin edistävät merkittävästi hiirten hyvinvointia, sillä suurin osa hiirten kohtaamista taudinaiheuttajista tulee juuri rehusta.

2.3.3 Rehun koostumuksen ja perimän vaikutukset hiirten hyvinvointiin ja lisääntymiseen

Hiirillä tehdään usein toksikologisia tutkimuksia, joissa hiirten ravintoon on lisätty jotain mahdollisesti haitallista ainetta, jonka vaikutusta hiirten hyvinvointiin seurataan (Morrissey ym. 1988). Joissain tutkimuksissa testataan myös rehuihin lisättyjen aineiden vaikutusta hiirten lisääntymiseen, mutta tällöinkin halutaan useimmiten vain tietää, onko kyseisillä aineilla haittavaikutuksia (Morrissey ym. 1988; Røykkynen ym. 2006). Hiirten lisääntymistä ei siis pyritä tehostamaan. Näistäkin tutkimuksista voi kuitenkin saada arvokasta tietoa rehun vaikutuksista hiirten lisääntymiseen, esimerkiksi Straussin tutkimusryhmä tutki soijapitoisen ruokavalion vaikutusta eturauhassyövän

yleisyyteen uroshiirillä (Strauss ym. 1998). Löytäessään yhteyden estrogeenin agonistina toimivan isoflavonoidi genisteiinin ja uroshiirten testosteronin erityksen heikkenemisen välillä he totesivat pohdinnassaan, että myös hiirten rehussa on paljon soijaa ja sitä kautta runsaasti genisteiiniä, joka saattaa vaikuttaa hiirten lisääntymistoimintoihin.

Geenimuunnelluilla hiirillä voidaan tutkia geenien ja ravitsemuksen vuorovaikutusta. Leptiini on proteiini, joka muun muassa säätelee lisääntymistä ja energian kulutusta (Zhang ym. 1994). Ylipainoisilla *ob/ob* -mutanttihiirillä leptiiniä ei erity. Leptiinipistoksiin käsiteltyjen hiirten rehun kulutusta seurattiin, ja havaittiin, että leptiini lisäsi hedelmättömien *ob/ob* -hiirten sukupuolihormonien eritystä ja hiirten sukuelinten painot nousivat (Barash 1996). Ylipainoiset hiiret myös laihtuivat leptiinin ansiosta. Tutkimuksen ansiosta voitiin todeta leptiinin rooli positiivisena signaalina normaalihierren lisääntymistoiminnoille.

Hiirten avulla voidaan tutkia myös puutostautien kehittymistä. Hiirille valmistetaan rehua, jossa on liian vähän esimerkiksi jotain elimistön toiminnalle välttämätöntä vitamiinia (Molina ym. 2008). Molinan tutkimusryhmä havaitsi, että kun hiiriemoille ja niiden poikasille syötettiin rehua, jossa oli vain vähän B12-vitamiinia, poikasten kasvu heikkeni. Kaikkien näiden tutkimusten avulla saadaan tietoa ravitsemuksen vaikutuksista hiirten hyvinvointiin ja lisääntymiseen, mutta rehun koostumuksen vaikutusta hiirten lisääntymiseen on tutkittu hyvin vähän.

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Joidenkin geenimuunneltujen ja sisäsiittoisten hiirikantojen hidas lisääntyminen hidastaa tutkimukseen tarvittavan hiirimäärän saamista. Toisaalta hitaan lisääntymisen aiheuttama odotus nostaa jo olemassa olevien hiirten hoitokustannuksia. Jos hiiret saataisiin lisääntymään nopeammin tässä tutkimuksessa käytetyllä SDS -erikoisrehulla, hoitokustannukset ja odotusaika pienenisivät. Tutkimukselle asetettiin seuraavat tavoitteet:

- 1) Selvittää, saako SDS -rehu huonosti lisääntyvät hiirikannat lisääntymään paremmin kuin R3 -rehu.
- 2) Selvittää, onko testattavilla rehuilla vaikutusta poikasten kasvuun ja vierotusikään.
- 3) Vertailla SDS- ja R3- rehujen vaikutusta hiirten lisääntymiskierron nopeuteen.

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1. Eläimet ja niiden ylläpito

Tässä työssä seurattiin Kuopion yliopiston valtakunnallisessa koe-eläinkeskuksessa tuotannossa olevien sisäsiittoisen C57BL/6J -hiirikannan (B6) ja kahden muuntogeenisen hiirikannan lisääntymistä. Muuntogeenisiä hiirikantoja APP^{swe} ja APP^{swe}/PS1dE9 tuotettiin Alzheimer-tutkimusta varten. APP^{swe} -hiirillä (APP) on perimässään ihmisen amyloidin esiasteproteiinin yliekspressio. APP^{swe}/PS1dE9 (ApdE9) -hiirillä on edellisen esiasteproteiinin yliekspression lisäksi preseniliinin 1 mutaatio. Lisämutaation vuoksi ApdE9-hiirien aivoihin alkaa kehittyä suvuttaiseen Alzheimerintautiin liittyviä amyloideja plakkeja jopa 1,5 kertaa nopeammin kuin APP -hiirten aivoihin (Borchelt ym. 1997). Kaikkien käytettyjen hiirikantojen poikastuotanto oli toivottua vähäisempää.

Molemmat geenimuunnellut hiirikannat on alun perin luonut tohtori D. Borchelt John Hopkins Universityssä Baltimoressa Yhdysvalloissa. Hiirikannat polveutuvat geenimuunnellusta F0 -polven kimeerasta, jolla on ollut B6 x CH3-Hej -tausta (Wang ym. 2002). Hiirikannoista on alun perin tehty geneettisesti yhtenäinen muoto takaisinristeyttämällä kyseinen hybridi 15 kertaa B6 -hiirikantaan (Gerlai 1996; Wang ym. 2002). Tässä tutkimuksessa käytetyt APP -urokset olivat polvea F16 ja ApdE9 -urokset takaisinristeytyksen polvea F10.

Eläinten tuotanto tapahtui parittamalla muuntogeeniset urokset sisäsiittoisen B6 -hiirikannan naaraitten kanssa. B6 -hiirikannan alkuperä oli The Jackson Laboratory (Maine, USA). Hiirikanta oli otettu Valtakunnallisessa koe-eläinkeskuksessa tuotettavaksi vuonna 2005. Verrokkina seurattiin B6 -hiirikannan siitospareja. Naaraita oli kahdessa ikäryhmässä, tutkimuksen alussa mukana olleet naarait olivat ”vanhoja” ja myöhemmin mukaan otetut naarait olivat ”nuoria”. Nuoremmat hiiret aloittivat seurannan suoraan parituksesta, joten ne eivät olleet lisääntyneet ennen tutkimuksen

alkua. Vanhemmat naaraat olivat tutkimusjakson alkaessa iältään noin 7-9 kuukautta, ja ne olivat synnyttäneet tutkimusjaksoa edeltäneiden 12 viikon aikana 1–3 poikuetta.

Vierotuspainojen seurannan alkaessa B6- ja APP -tuotannossa oli kummassakin kolme keskenään suunnilleen samanikäistä siitosparia. ApdE9- hiirten parituksessa oli 2-3 B6 -naarasta yhtä urosta kohden. Myöhemmin tutkimukseen otettiin lisää yhdeksän keskenään suunnilleen samanikäistä B6-kannan paria, sekä 2-3 nuorta B6 -naarasta kullekin ApdE9 -hiirikannan urokselle.

Koska ApdE9 -tuotannon naaraat olivat ryhmissä, ne erotettiin toisistaan häntämerkinnöin. Kantavat naaraat siirrettiin kantoaikana synnyttämään ja hoitamaan poikasensa erilleen muista ryhmän hiiristä. Kun poikaset oli vierotettu, naaras siirrettiin takaisin uroksen ja toisten naaraiden luo paritukseen. Tällä tavalla voitiin tehdä poikuekohtaista seurantaa.

Hiiret olivat tutkimuksen ajan SPF-tason barrierissa, B6 -kannan hiiret eri huoneessa kuin muuntogeeniset hiiret. Eläinhuoneiden ilma vaihtui 15 kertaa tunnissa, suhteellinen ilmankosteus oli noin 55 % ja lämpötila noin 22 °C. Geenimuunnellut hiiret olivat toisessa huoneessa, jonka lämpötila ja ilmankosteus olivat samat kuin B6-hiirten huoneessa. Hiiret pidettiin kiinteäpohjaisissa, ruostumatonta terästä olevissa häkeissä (42 x 25 x 15 cm, Franke Finland Oy), joissa oli haapakuiviketta (Tapvei Oy, Kaavi). Kaikille hiirille annettiin lisäksi puolikas paperipyyhe (Lotus Plus Handtovel Z-fold, Georgia-Pacific Nordic Oy, Nokia) sekä noin kourallinen haapapesämateriaalia (Tapvei Oy, Kaavi). Huoneiden valaistus vaihtui 12 tunnin välein normaalista päivävalaistuksesta öiseen punavaloon, jolloin normaalivalot olivat sammuksissa. Normaalivalot syttyivät kello 7:00 ja sammuivat kello 19:00.

Hiirten ja rehun punnitukset tehtiin häkinvaihdon yhteydessä kerran viikossa. Kaikki käytössä olleet rehut, häkit, kuivikkeet ja virikkeet olivat autoklavoimalla steriloituja. Hiirten juomavesi oli UV-säteilytettyä. Barrierieläinten terveystarkkailu tapahtui FELASAn suositusten mukaan (Nicklas ym. 2001). Näiden tulosten perusteella eläimet olivat vapaita FELASAn terveystarkkailusuositusten listaamista taudinaiheuttajista.

4.2. Tutkimuksen aikana tehdyt mittaukset

Tutkimuksen aikana hiiret vaihdettiin puhtaisiin häkkeihin kerran viikossa, ja samalla hiirille annettiin uusi rehuannos. Poikaset punnittiin vasta vierotuksen yhteydessä, ja punnitukset tehtiin kerran viikossa. Poikuetiedoista seurattiin poikueiden ja poikasten määrää ja synnytysten aikaväliä. Myös poikuekuolleisuuden osuus kaikista syntyneistä poikueista ja vierotettujen poikasten osuudet elävänä syntyneistä poikasista laskettiin emokohtaisesti.

4.3. Ruokinta

Taulukkoon 1 on koottu SDS- ja R3- rehujen ravintoarvot. Merkittävin ero rehujen välillä oli rasvan määrässä, R3-rehu sisältää rasvaa 5 prosenttia, kun taas SDS-rehussa sitä oli 10 prosenttia. SDS-rehuun oli myös lisätty enemmän vitamiineja kuin R3-rehuun. Taulukossa 1 ilmoitetut suositustasot on laskettu konventionaalioloissa ylläpidetyille hiirelle (National Research Council ym. 1995).

Taulukko 1. Kokeessa käytettyjen rehujen koostumukset.¹

Ravintoarvo (%)	R3	SDS	suositus
raakaproteiini	21	20,1	18
raakarasva	5	10,1	5
NFE ²	51,5	51,5	*
kuitu	3,5	3,5	>30
vesi	<12	10	*
tuhka	7	5	*
energia (kcal/kg)	3010	3520	n.2630-3110
Mineraalit (%)			
Ca	1,1	0,9	0,5
P	0,8	0,6	0,3
Na	0,7	0,2	0,1
Cl	0,7	0,3	0,1
Mg	0,2	0,2	0,1
K	0,8	0,7	0,2
Hivenaineet			
Cu	30	20,8	6
Fe	190	216	3,5
Mn	115	100	10
Zn	120	80,4	30
I	2	2,3	0,15
Co	1	0,5	-
Vitamiinit (SDS ja R3: lisätty (IE/kg) ³ , suositus: kokonaismäärä (IE/kg) ³)			
A	12000	15000	2400
D	1500	2000	1000
E	21	185	22
K1	0,25	60	1
K3	10	60	1
B1	3	25	1700
B2	12	25	-
B6	4	20	8
B12	0,02	0,1	10
capantotenaatti	10	35	16
koliinikloridi	1000	475	2000
niasiini	40	-	15

¹ National Research Council (1995) mukainen

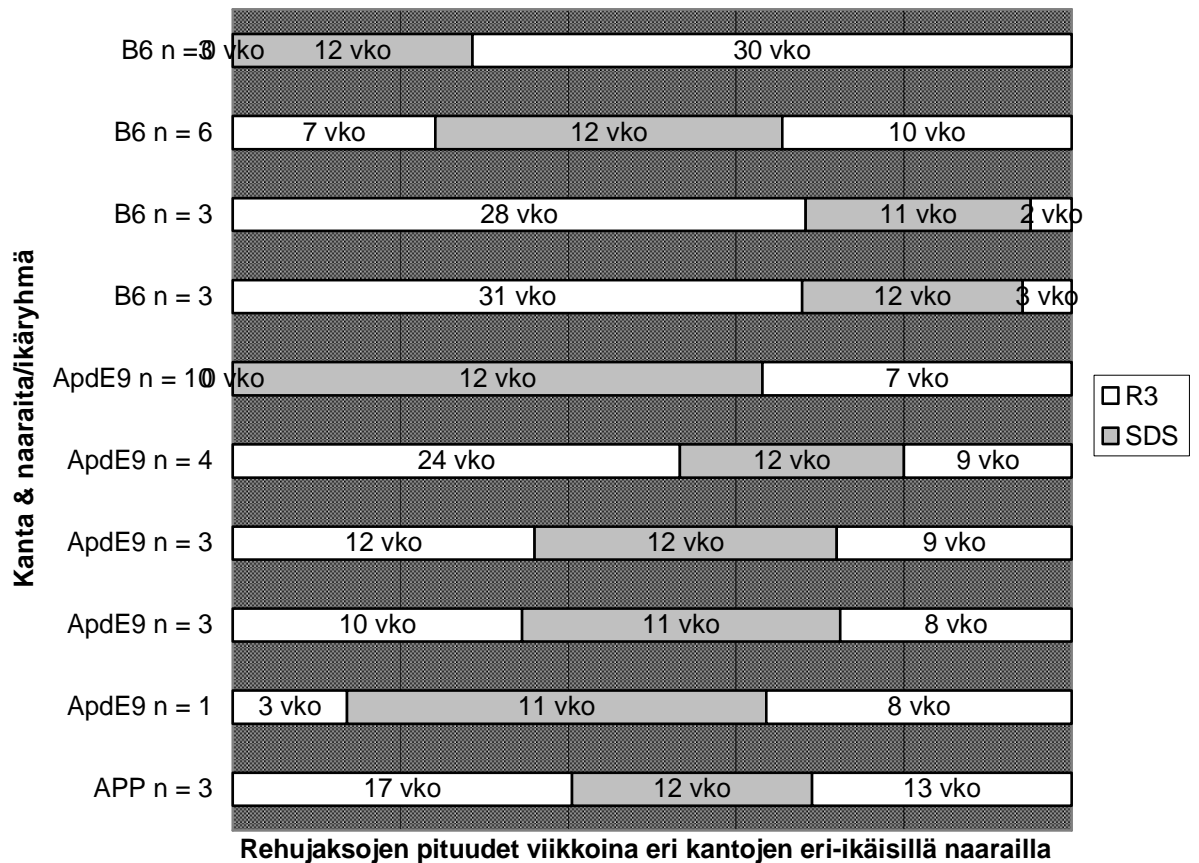
² typtömät uuteaineet eli sokerit, tärkkelys, fruktaanit, pektiinit, orgaaniset hapot ja pigmenttiaineet

³ kansainvälistä yksikköä/kg

* ei tietoa saatavilla

Kuvassa 1 kunkin ikäryhmän hiirten rehujaksot on esitetty aikajärjestyksessä viikkomääräisesti. R3 -kausien pituudet ennen ja jälkeen SDS -kautta vaihtelevat, mutta SDS -kausi on kaikilla hiirillä ollut 11–12 viikkoa. Nuoremman polven hiiret aloittivat kokeen suoraan SDS -kaudella, kun taas vanhemman polven hiirillä oli ollut R3 -kausi ennen SDS -

kautta. Pyrkimyksenä oli saada kaikille hiirille yhteensä samanmittainen seurantakausi, joka oli kuitenkin lopetuksista ja ikäeroista johtuen noin 22–49 viikkoa.



vko = viikkoa

Kuva 1. Kunkin rehujakson pituus viikkoina eri-ikäisillä hiirinaarailla

Tutkimuksessa käytetyt vanhemmat siitosparit olivat ennen tutkimuksen alkua olleet siitoksessa jo noin 4-6 kuukautta, jona aikana ne olivat syöneet normaalia R3 -rehua kuvan 1 mukaisesti. Näillä tutkimuksen alkuperäisillä hiirillä oli yli kymmenen viikon R3 -kausi, ennekuin ne siirrettiin 12 viikkoa kestäneelle SDS -kaudelle. Myöhemmin tutkimukseen otettiin mukaan yhdeksän B6-naarasta ja 11 ApdE9-naarasta. Näiden naaraitten SDS -kausi alkoi heti parituksesta tai pian parituksen jälkeen (kuva 1). 12 viikon SDS -kauden jälkeen rehu vaihdettiin kaikilla hiirillä R3 -rehuksi. Rehun vaihtaminen johtui siitä, että tutkimuksessa käytetyt hiiret toimivat itse itsensä kontrolleina (kuva 1).

4.4. Poikastuotannon, rehunkulutuksen ja hiirten painon seurannan toteutus

Syntyneet ja vierotetut sekä kuolleet poikaset ja poikueet laskettiin. Kolmesta neljään viikon ikäiset poikaset vierotettiin, jolloin ne myös punnittiin. Vierotuspäätös tehtiin hiirten painon ja kehitystason perusteella; hiirten tuli painaa vähintään viisi grammaa ja niiden korvien tuli olla avoimet ja pystyssä. Hiirten tuli myös olla vilkasliikkeisiä ja elinvoimaisia. Jos yksikin hiiri oli liian heikko tai pieni, koko poikueen vierotusta siirrettiin viikolla. Vierotukset tapahtuivat häkinvaihdon ja rehunpunnituksen yhteydessä, eli poikasten soveltuvuutta vierotukseen ei seurattu päivittäin.

Vanhempien hiirten seuranta päättyi siinä vaiheessa, kun ne poistettiin parituksesta. Nuoremmilla naarailla seuranta lopetettiin R3 -rehujaksoon kaikilla jäljellä olevilla naarailla samana päivämääränä niin, että pian seurannan päättymisen jälkeen syntyneet poikueet otettiin tuloksiin mukaan (emot jatkoivat R3 -rehun syöntiä seurannan jälkeenkin).

4.5. Tulosten käsittely

Seurannan aikana kerättiin emokohtaista tietoa syntyneistä poikueista, poikasista ja emopareista. Tulokset on esitetty keskiarvoina ja keskihajontoina ja tulosten tilastollinen merkitsevyys on testattu tilastotieteellisin menetelmin (SPSS 15,0, SPSS Inc.). Tilastollisissa analysoinneissa tutkittavina parametreina olivat poikasten määrä, vierotuspaino ja vierotusikä, poikuekoko ja poikasten kuolleisuus. Vaikuttavina tekijöinä olivat kanta, emojen ikä, rehu ja poikasten sukupuoli. Aineiston normaalijakautuneisuus tarkastettiin Kolmogorov-Smirnovin ei-parametrisella testillä. Normaalijakautuneen aineiston ryhmien välisiä eroja testattiin yksiulotteisesti yleisellä lineaarisella mallilla (GLM). Ei-parametrisia testejä käytettiin silloin, kun aineisto ei ollut normaalijakautunutta, esimerkiksi rehujen vaikutukset poikuemääriin testattiin Friedmanin testillä. Myös Mann-Whitneyn ei-parametrinen testiä käytettiin, kun tutkittiin emon iän vaikutusta poikasten ja poikueiden määriin ja poikasten vierotuspainoihin ja vierotusikiin. Lopuksi laskettiin, onko ruokavaliolla tilastollisesti merkityksellistä vaikutusta hiirten lisääntymiseen muuntogeenisissä tai sisäsiittoisissa kannoissa.

5. TULOKSET

5.1. Syntyneiden poikueiden ja poikasten määrät

Tässä tutkimuksessa seurattiin kahden muuntogeenisen ja yhden sisäsiittoisen hiirikannan lisääntymistä kahdella eri rehulla. Naaraitten poikastuotantoa seuraamalla saatiin selville, onko erikoisruokavaliolla vaikutusta hitaasti lisääntyvien hiirikantojen poikastuotantoon. Myös naaraitten iän vaikutusta poikastuotantoon eri rehujaksoilla tutkittiin.

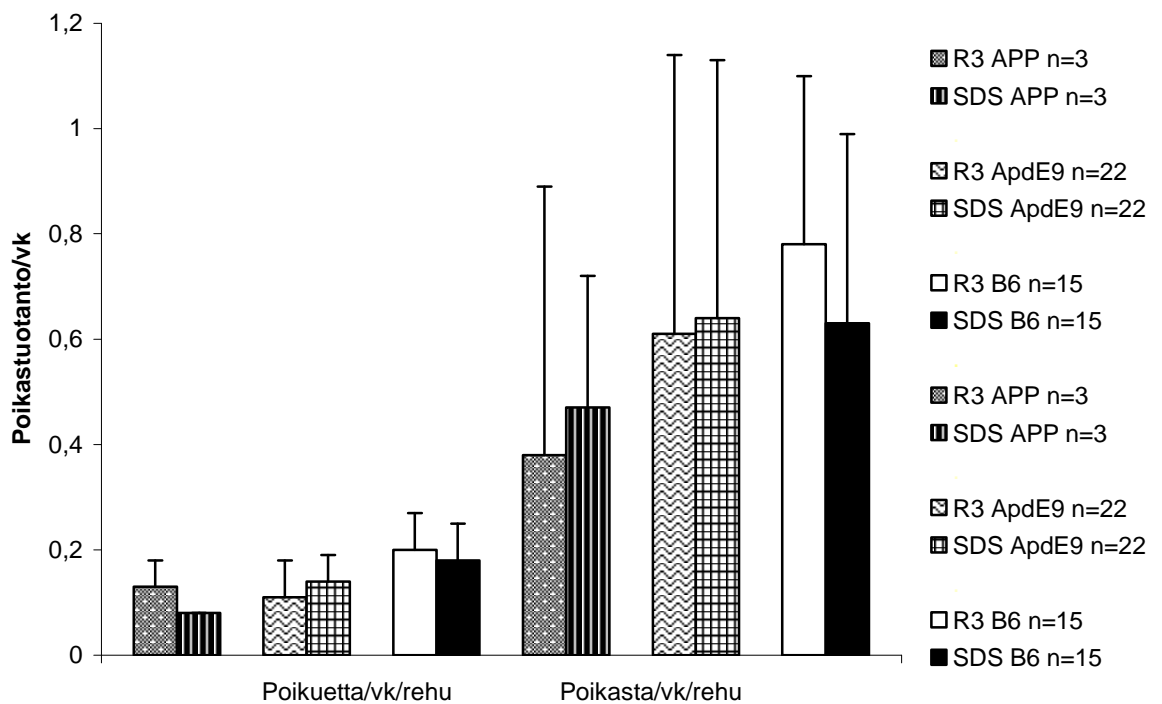
Taulukkoon 2 on kerätty tutkimuksen aikana syntyneiden poikueiden ja poikasten tiedot. Lisäksi taulukossa on mukana vanhempien naaraitten ennen tutkimusta synnyttämät poikueet ja poikaset. Vanhemmat naaraat olivat olleet ennen tutkimusjaksoa R3 -rehulla, ja synnyttäneet vaihtelevasti poikueita. Nuoremmista naaraista kaksi jäi ilman poikasia R3 -kauden aikana. Poikasten määrä vaihteli huomattavasti poikueittain. Kun poikasia ei ole niiden kuoleman vuoksi voitu laskea, on niiden lukumäärä jätetty lisäämättä taulukko 2:een.

Taulukko 2. Emokohtainen poikastuotanto ennen seuranta- ja seurantajaksojen aikana.

Kanta ja naaras	R3 -rehu- kauden pituus (vko)	R3 -rehu syntyneitä poikueita (yht,kpl)	R3 -rehu syntyneitä poikasia (yht,kpl)	SDS -rehu- kauden pituus (vko)	SDS -rehu syntyneitä poikueita (yht,kpl)	SDS -rehu syntyneitä poikasia (yht,kpl)
Vanhat naaraat						
APP 1	31	6	30	12	1	9
APP 2	31	3	4	12	1	5
APP 3	29	3	1	12	1	3
ApdE9 1	16	1		12	1	8
ApdE9 2	34	4	4	12	3	
ApdE9 3	18	2	7	12	2	
ApdE9 4	32	5	19	12	2	13
ApdE9 5	20	3	11	12	2	20
ApdE9 6	21	1	5	11	2	3
ApdE9 7	20	2	10	12	1	5
ApdE9 8	34	3	18	12	2	13
ApdE9 9	24	2	9	12	2	4
ApdE9 10	20	1		12	1	9
ApdE9 11	18	2	8	11	1	6
B6 1	39	5	29	12	4	8
B6 2	31	4	23	12	3	11
B6 3	32	6	38	12	3	15
B6 4	31	5	24	12	3	7
B6 5	30	3	11	11	1	3
B6 6	37	7	32	11	2	10
Nuoret naaraat						
ApdE9 12	7	2	11	12	2	
ApdE9 13	7	1	9	12	1	7
ApdE9 14	7	1	10	12	2	19
ApdE9 15	7	0	0	12	1	6
ApdE9 16	7	1	7	12	2	9
ApdE9 17	7	1	10	12	1	9
ApdE9 18	7	1	5	12	2	17
ApdE9 19	7	1	7	12	2	7
ApdE9 20	7	0	0	12	1	6
ApdE9 21	7	1	9	12	2	8
B6 7	17	5	4	12	3	11
B6 8	17	2	13	12	2	12
B6 9	17	4	7	12	2	9
B6 10	17	4	16	12	2	4
B6 11	17	5	11	12	2	9
B6 12	17	5	21	12	2	7
B6 13	17	4	23	12	2	
B6 14	17	3	16	12	1	
B6 15	17	3	9	12	1	7

ApdE9-kannan nuoremman polven poikueita ei ennätetty vierottaa ennen tutkimuksen loppua ,
(vko) = viikko

SDS -kausi oli kaikilla naarailla suunnilleen samanmittainen, mutta R3 -kauden pituuksissa oli etenkin vanhemmilla naarailla huomattavia eroja (taulukko 2). Jaksojen pituuserojen vaikutus tuloksiin poistettiin jakamalla kunkin emon poikastuotanto rehujaksojen viikkomääräisellä pituudella. Kuvassa 2 tämä viikkokohtainen tuotanto eri rehujaksoilla on ilmoitettu hiirikannoittain.



n = naaraitten lukumäärä

Kuva 2. Poikueiden ja poikasten viikoittaiset määrät eri rehuilla (keskiarvo \pm keskihajonta).

Kuvassa 2 on vasemmalla puolella ilmoitettu syntyneet poikueet kullekin kannalle R3- ja SDS -rehujaksoilla ja oikealla puolella syntyneet poikasmäärät molemmilla rehujaksoilla. Poikue- ja poikasmäärät pysyivät samoina rehusta riippumatta (molemmille rehun vaikutus $p = 0,1$, Friedman, tuloksia ei ole esitetty).

Jotkin tutkimuksessa mukana olleet naaraat söivät toistuvasti poikasensa (taulukko 2, esimerkiksi naaraat ApdE9 2 ja ApdE9 3 sekä B6 -naaras 13). Yhteensä APP -naaraat söivät seitsemän poikuetta. ApdE9 -naaraat 28 poikuetta ja B6 -naaraat 34 poikuetta. Tuloksessa

ovat mukana myös ennen seurantaan syntyneet poikueet. Rehulla ei ollut vaikutusta poikueiden ja poikasten hävikkiin ($p = 1,0$ ja $p = 0,257$, Friedman, tuloksia ei ole esitetty).

Emon iällä ei ollut poikasten tai poikueiden määrään vaikutusta (testi oli Mann-Whitney, $p = 0,813$ poikueille ja $p = 0,322$ poikasille, tuloksia ei ole esitetty). Myös emon iän vaikutusta poikasten vierotusikään ja -painoon testattiin, mutta emon iällä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta poikasten vierotusikään eikä poikasten vierotuspainoihin (testi: Mann-Whitney, emon iän vaikutus vierotusikään R3 -rehulla kolmeviikkoisina vierotetuille poikueille $p = 0,121$ ja neliviikkoisina vierotetuille $p = 0,052$; poikasille kolmeviikkoisina $p = 0,134$ ja neliviikkoisina $p = 0,192$; SDS -rehulla $p = 0,883$ kolmeviikkoisina ja $p = 0,799$ neliviikkoisina vierotetuille poikueille; kolmeviikkoisina vierotetuille poikasille $p = 0,547$ ja neliviikkoisina vierotetuille $p = 0,678$, testi: yleinen lineaarinen malli (GLM), emon iän vaikutus vierotuspainoon $p = 0,132$, tuloksia ei ole esitetty).

5.2. Rehun vaikutus poikasten vierotusikään

Taulukossa 3 on vertailtu rehun vaikutusta vierotusikään. Mukaan on laskettu kolmeviikkoisina vierotettujen poikueiden osuus prosenttiosuutena kolme- ja neliviikkoisina vierotettujen poikueiden yhteismäärästä. Kun kaikkien hiirikantojen tulokset olivat mukana, kolmeviikkoisina vierotettujen poikasten osuuksissa kaikista vierotetuista oli selkeä ero rehujaksojen välillä: SDS -rehujaksolla geenimuunneltujen urosten poikaset vierotettiin nuorempana, kuin R3 -kauden aikana ($p = 0,001$, Friedman).

Taulukko 3. Kolmeviikkoisina vierotettujen poikueiden osuus kaikista kolme- ja neliviikkoisina vierotetuista (keskiarvo \pm keskihajonta)

kanta	vierotetut poikueet		poikueet, % kaikista vierotetuista poikueista		p ¹ rehun vaikutus (% kaikista vier.)
	R3 -rehu 3vk (kpl)	SDS -rehu 3vk (kpl)	R3 -rehu 3vk, (kpl)	SDS -rehu 3vk, (kpl)	
APP	0,3 \pm 0,6	1 \pm 0,0	8,3 \pm 14,4	100 \pm 0	0,083
ApdE9	0,1 \pm 0,4	0,8 \pm 0,7	6,8 \pm 17,6	56,8 \pm 47,1	0,005
B6	2,3 \pm 1,3	1,2 \pm 0,9	82,3 \pm 29,8	80 \pm 41,4	0,414

¹ Friedmanin ei-parametrinen testi

vk = viikko,

vier= vierotetut

SDS -rehukaudella osa poikueista vierotettiin aikaisemmin kuin R3-rehukaudella (taulukko 3). APP-urosten kanssa paritettujen naaraitten poikastuotannossa rehulla ei ollut vaikutusta kolmeviikkoisten poikasten osuuteen kaikista vierotetuista ($p = 0,083$, Friedman), vaikka SDS -rehujakson aikana kaikki poikueet oli pystytty vierottamaan jo kolmeviikkoisina. Merkitsevyyden puuttuminen johtunee APP -urosten naaraiden ja poikasten vähäisestä määrästä. ApdE9 -urosten poikueiden vierotusikään rehulla oli selkeästi vaikutusta ($p = 0,005$, Friedman). SDS -rehukaudella 57 % poikueista vierotettiin jo kolmeviikkoisina, kun taas R3 -kaudella vain 7 % vierotettiin kolmeviikkoisina. Rehulla ei ollut vaikutusta B6 -hiirikannan kolmeviikkoisina vierotettujen poikueiden osuuteen kaikista vierotetuista ($p = 0,414$, Friedman).

5.3. Poikasten vierotuspainot

Poikaset punnittiin aina vierotushetkellä, ja taulukossa 4 on esitetty rehun vaikutus poikasten vierotuspainoon. Tilastollinen testi oli yleinen lineaarinen malli (GLM). Ainoastaan joko kolme- tai neliviikkoisina vierotetut poikaset on laskettu mukaan tuloksiin (taulukko 4). Samoin jos poikaset ovat syntyneet yhden ja vierotettu toisen rehukauden aikana, on ne jätetty huomioimatta.

Taulukko 4. Rehun vaikutus poikasten vierotusikään ja vierotuspainoon (keskiarvo \pm keskihajonta)

kanta	rehu	vier. 3vk	vier. 4vk	paino (g) 3vk	paino (g) 4vk
APP	R3	-	8	-	12,1 \pm 3,8
	SDS	6	7	11,8 \pm 1,2	13,2 \pm 1,5
				p ¹ -	p ¹ = 0,477
ApdE9	R3	20	25	7,5 \pm 2,1	7,6 \pm 1,4
	SDS	85	23	8,3 \pm 1,1	11,9 \pm 4,9
				p ¹ = 0,018	p ¹ < 0,001
B6	R3	60	5	6,6 \pm 0,8	6,5 \pm 1,3
	SDS	70	1	8,4 \pm 1,5	7,2
				p ¹ < 0,001	p ¹ = 0,66

¹ yleinen lineaarinen malli (GLM)

vk=viikko,

vier = vierotettuja

Kaikki APP -hiirikannan poikaset vierotettiin R3-ruokinnan aikana neliviikkoisina, kun taas SDS -rehukauden aikana melkein puolet poikasista vierotettiin kolmeviikkoisina (taulukko 4). Siksi rehun vaikutus APP -urosten poikasten vierotuspainoihin testattiin vain neliviikkoisina vierotetuilla poikasilla, joiden vierotuspainoon rehulla ei ollut vaikutusta (p = 0,477, GLM). ApdE9-urosten poikasista vierotettiin R3-rehukauden aikana 44 % kolme- ja 56 % neliviikkoisina. Vastaavasti SDS -rehukauden aikana vierotetuista poikasista peräti 79 % vierotettiin kolmeviikkoisina, ja enää vain 21 % neljäviikkoisina. SDS -rehu lisäsi merkitsevästi eri-ikäisinä vierotettujen ApdE9 -urosten poikasten vierotuspainoja (p = 0,018 kolmeviikkoisina vierotetuille ja p < 0,001 neliviikkoisina vierotetuille poikasille, GLM).

Rehun vaikutuksen vierotusikään voi havaita myös Taulukon 3 poikueiden vierotusosuuksista. SDS -rehu lisäsi myös merkitsevästi myös B6 -hiirikannan poikasten vierotuspainoja ($p < 0,001$, GLM).

SDS -rehua saaneet poikaset olivat vierotushetkellä keskimäärin 1-2 grammaa painavampia kuin R3 -rehua saaneet kaikilla kannoilla (taulukko 4). Erityisen suuri ero vierotuspainoissa oli ApdE9 -hiirikannan neliviikkoisilla poikasilla. SDS -rehua saaneet APP- ja ApdE9 -poikasilla neliviikkoisina vierotettujen paino näyttäisi olevan selvästi suurempi kuin kolmeviikkoisina vierotettujen (ei testattu tilastollisesti), kun taas R3 -rehulla tätä eroa ei näytä olevan. Tämäkin viittaa siihen, että poikaset kasvoivat paremmin SDS -rehulla. SDS sai myös B6 -hiirikannan poikaset kasvamaan kolmessa viikossa isommiksi kuin R3 -rehukaudella.

Vierotuspainoon vaikuttaa vierotusiän lisäksi sukupuoli. Siksi Taulukossa 5 on vertailtu eri sukupuolten vierotuspainoja niin, että vierotusiän vaikutus vierotuspainoon on otettu huomioon. SDS -rehu lisäsi poikasten vierotuspainoa kummallakin sukupuolella ja kummassakin ikäryhmässä, lukuun ottamatta APP -hiirikannan neliviikkoisina vierotettuja poikasia ja ApdE9 -kannan kolmeviikkoisina vierotettuja uroksia. SDS -rehulla kolmeviikkoisina vierotettujen ApdE9 -hiirikannan naaraitten paino oli yli kaksi grammaa suurempi kuin R3 -rehulla ($p = 0,004$, GLM). Neliviikkoisina vierotetuista ApdE9 -poikasista SDS -rehulla kasvaneet urokset olivat viisi ja naaraat kolme grammaa painavampia kuin R3 -jaksolla ($p = 0,01$ uroksilla ja $p = 0,02$ naarailla, GLM). APP -urosten poikasia ei vierotettu R3 -rehulla kolmeviikkoisina, joten rehun vaikutusta niiden vierotuspainoihin ei voitu testata. Rehulla oli vaikutusta myös kolmeviikkoisina vierotettujen B6 -hiirikannan poikasten vierotuspainoihin sekä uroksilla ($p < 0,001$, GLM) että naarailla ($p < 0,001$, GLM), painon lisäys oli lähes kaksi grammaa. B6 -hiirikannan poikasia ei vierotettu neliviikkoisina SDS -rehulla, joten rehun vaikutusta niiden vierotuspainoihin ei voitu testata.

Taulukko 5. Rehun vaikutus sukupuoltenvälisiin painoeroihin
(keskiarvo ± keskihajonta)

kanta	rehu	uroksia (kpl) 3 vk	naaraita (kpl) 3 vk	urokset 3 vk (g)	naaraat 3 vk (g)	uroksia (kpl) 4 vk	naaraita (kpl) 4 vk	urokset 4 vk (g)	naaraat 4 vk (g)
APP	R3	-	-	-	-	4	4	14,4 ± 0,7	9,8 ± 4,4
	SDS	3	3	12,4 ± 1,2	11,2 ± 1,1	3	4	14,6 ± 0,2	12,3 ± 1,1
				p ¹ -	p ¹ -			p ¹ = 0,748	p ¹ = 0,322
ApdE9	R3	12	8	8,0 ± 2,2	6,8 ± 1,8	8	17	7,5 ± 1,8	7,7 ± 1,4
	SDS	32	53	8,7 ± 1,2	8,0 ± 1,0	13	10	12,8 ± 5,0	10,7 ± 4,7
				p ¹ = 0,166	p ¹ = 0,004			p ¹ = 0,01	p ¹ = 0,02
B6	R3	29	31	6,61 ± 0,8	6,6 ± 0,8	2	3	7,2 ± 2,1	6,1 ± 0,5
	SDS	35	35	8,4 ± 1,4	8,4 ± 1,7	-	-	-	-
				p ¹ < 0,001	p ¹ < 0,001			p ¹ -	p ¹ -

¹ yleinen lineaarinen malli (GLM)

vk = viikko

6. POHDINTA

6.1. Rehun vaikutus syntyneiden poikueiden ja poikasten lukumääriin

Tutkimuksessa verrattiin kahden rehun vaikutusta geenimuunneltujen ja sisäsiittoisten hiirten lisääntymiseen seuraamalla poikueiden ja poikasten lukumääriä sekä poikasten vierotuspainoja ja -ikää. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voiko pelkästään rehua vaihtamalla saada hiiret lisääntymään paremmin.

Testatuilla rehuilla ei ollut vaikutusta poikasten ja poikueiden määriin, kuten ei naaraitten iälläkään. Tuloksiin vaikuttaa kuitenkin virhettä tuottavina tekijöinä seurantajaksojen pituuden huomattava vaihtelu eri rehujaksojen välillä, sekä se, että osa eläimistä oli seurannan alkaessa joko huomattavan nuoria tai huomattavan vanhoja. Niinpä tämän tuloksen luotettavuus ei ole paras mahdollinen. Lisäksi ravitsemustutkimuksissa käytetään yleensä metaboliahäkkeitä, jolloin rehua ei mene hukkaan. Tässä tutkimuksessa rehun kulutusta ei voitu seurata, koska tutkimuksessa käytettiin kiinteäpohjaisia teräshäkkeitä, joissa olleiden hiirten määrä muuttui parituksen vaiheiden ja synnytysten mukaan. Tutkimus toteutettiin VKEK:n normaalin parituskäytännön mukaisesti, koska kyseessä oli todellinen eläinten tuotanto, eikä sen toteuttamiseen haluttu puuttua. Tutkimuksessa haluttiin katsoa asioita todellisessa käytännön normaalitilanteessa, jossa siitoseläinten otto tuotantoon ja vierottaminen tapahtuvat normaalien tuotantorutiinien mukaisesti. Tällöin mukana on kaikki normaalitoiminnan elementit, mikä kuitenkin heikentää varmojen johtopäätösten tekemistä eri vaikuttavien tekijöiden suhteen. Tutkimuksen toteutustavasta johtuen tästä tutkimuksesta ei kuitenkaan voitu saada luotettavia tuloksia erikoisrehun käytön vaikutuksista hiirten lisääntymistulokseen.

Tutkimuksessa oli mukana useita naaraita, joiden poikaset eivät eläneet vierotusikäisiksi. Naaraat siis synnyttivät poikueita, mutta poikaset katosivat pesästä yleensä parin päivän sisällä synnytyksestä. Todennäköisesti kyse oli siitä, että naaraat söivät omat poikasensa. Tällainen käytös on kannibalismia, joka on osa naaraan ympäristön oloihin mukauttavaa puolustusta (Hedrich 2006). Kannibalismin ansiosta emo varmistaa resurssiensa riittämisen

seuraavien sukupolvien tuottamiseen. Syynä kannibalismiin on voinut olla stressi, joka on voinut johtua melusta tai muista ympäristön tekijöistä. Ympäristötekijöistä johtuva kannibalismi voisi olla selityksenä poikashävikkiin. Rehulla ei ollut tähän vaikutusta. Tosin on mahdotonta tietää, oliko pesistä kadonneet poikaset aina tapettu vai olivatko poikaset ensin kuolleet ja naaraat syöneet ne vasta kuoleman jälkeen.

SDS -rehu on kehitetty nimenomaan parantamaan muuntogeenisten hiirikantojen lisääntymistulosta. Tutkimuksessa SDS -rehu ei parantanut lisääntymistä R3 -siitos -ja ylläpitorehuun verrattuna, joten voi olla, että jo R3:n avulla saavutetaan suurin mahdollinen poikastuotanto sisäsiitteisillä ja muuntogeenisillä hiirikannoilla. Lisäksi monissa tutkimuksissa on esitetty useita ympäristön ja hiirten perimän tekijöitä, jotka saattavat huonontaa hiirten lisääntymistulosta, kuten muut hiiret, äänet ja käsittely (Marchlewska-Koj 1997; Anthony ym. 1959; Nawrot ym. 1980). Tässäkin tutkimuksessa huonoon lisääntymistulokseen ovat todennäköisesti vaikuttaneet useat muutkin tekijät rehun lisäksi, esimerkiksi mahdollisesti stressaantuneet tai hoivaominaisuuksiltaan huonot naaraat. Tällaisten naaraitten lisääntymiseen ei rehun vaihtaminen välttämättä vaikuta.

6.2. Rehun vaikutus poikasten vierotusikään ja -painoon

Vierotusiän aikaistuminen APP- ja ApdE9 -hiirikantojen poikasilla ja poikueilla johtui siitä, että poikaset kasvoivat SDS -rehukaudella vierotuspainoisiksi R3 -rehukauteen verrattuna huomattavasti nopeammin. Poikasten myös kehittyivät SDS -rehukaudella nopeammin, sillä niiden korvat avautuivat päänmyötäisistä pystyiksi jo kolmessa viikossa ja poikaset olivat R3 -kaudella vierotettuihin poikasiin verrattuna silmämääräisesti havainnoiden huomattavasti virkeämpiä ja elinvoimaisempia. B6 -poikasten vierotusikiin rehun vaihdolla ei ollut vaikutusta, koska lähes kaikki poikaset voitiin joka tapauksessa vierottaa kolmeviikkoisina jo ennen rehun vaihtoa. Kolmeviikkoisina vierotetut ApdE9- ja B6 -hiirikantojen poikaset olivat samanpainoisia. Silti valtaosa ApdE9 -urosten poikasista vierotettiin R3 -rehukauden aikana vasta neliviikkoisina, koska yksi vierotuskriteeri oli poikasten kehitys ja elinvoimaisuus. R3 -rehukauden aikana ApdE9 -urosten poikueissa oli usein osa poikasista muita suurempia, mutta mukana oli myös hyvin pieniä poikasista, ja poikasten vierottamista lykättiin kehittyneisyyden ja elinvoimaisuuden perusteella.

SDS -rehukaudella neliviikkoisina vierotetut B6 -hiirikannan poikaset eivät kasvaneet nopeasti, toisin kuin kolmeviikkoisina vierotetut SDS -rehulla ruokitut saman kannan poikaset. Tämä johtuu kuitenkin vain siitä, että SDS -rehulla neliviikkoisina vierotettuja B6 -hiirikannan poikasia oli vain yksi, jolloin tuloksia ei voida analysoida tilastollisesti.

Se, että SDS -rehua syöneet kolmeviikkoisina vierotetut ApdE9 -naaraspoikaset olivat painavampia kuin R3 -rehua syöneet naaraat voi johtua SDS -rehun mahdollisesta kehitystä nopeuttavasta vaikutuksesta, jonka ansiosta naaraat saavuttivat puberteetin normaalia nopeammin. Tällöin niiden kasvupyrähdys alkoi jo alle kolmeviikkoisena. Koska urospoikaset saavuttavat puberteetin joka tapauksessa myöhemmin kuin naaraat (Silver 1995; Poole 1999), niiden kasvupyrähdys ei ollut alkanut vielä alle kolmeviikkoisena. Neliviikkoisina vierotettujen ApdE9 -urosten poikasten vierotuspainoihin rehulla oli selvä vaikutus, jonka voisi selittää urosten kasvupyrähdyksen alkaminen.

6.3. Rehun koostumuksen vaikutus poikasten kehitykseen

SPF-barrieriin vietävä R3 -rehu autoklavoidaan, jolloin siitä tulee käsittelemätöntä R3- rehua kovempaa (Nojima ym. 2006). Yksi syy poikasten nopeampaan kasvuun ja kehitykseen SDS -rehulla voikin olla se, että SDS-rehupelletit autoklavoidaan valmistuksen aikana, jolloin pelletit ovat kovia R3-pellettejä ilmavampia ja helpommin murenevia. SDS-rehu ei kovetu autoklavoitaessa, joten poikaset voivat alkaa syödä sitä emon maidon rinnalla normaalia aikaisemmin. Tiedetään, että liian kovat pelletit hidastavat poikasten kasvua (Ford 1977; Koopman ym. 1989). Hidas kasvu voi johtua siitä, että kovien pellettien syönti on kasvaville poikasille haastavaa ja syöminen itsessään lisää energian kulutusta. Poikaset alkavat syödä kiinteää ravintoa emon maidon rinnalla jo 11-12 päivän iässä (Poole 1999), eli lähes kaksi viikkoa ennen vierotusta. Jos poikaset voivat emon maidon lisäksi myös syödä kiinteää ravintoa, saavat ne helpommin kasvuun tarvitsemansa päivittäisen energian ja ravinteet, kuin jos ravintolähteenä olisi pelkästään emon maito. Hiirinaaraan maidontuotanto kestää noin neljä viikkoa, mutta maidontuotanto ehtyy imetyskauden loppupuolella, joten on hyvin tärkeää, että poikaset voivat tuolloin jo syödä kiinteää ravintoa (Green 1966).

Kirjallisuudesta löytyy hämmästyttävän vähän tutkimustietoa rehun ravintotekijöiden vaikutuksesta sisäsiittoisten ja muuntogeenisten hiirikantojen lisääntymiseen yleensä tai kantakohtaisesti. Kukin kanta on yksilöllinen ravinnontarpeidensa suhteen, joten yleistietoutta ei liene olemassakaan, vaan on selvitettävä tapauskohtaisesti, mikä rehu antaa parhaan lisääntymistuloksen (National Research Council ym. 1995). Lisäksi eri lähteissä hiirten energiantarpeet ja kulutetun rehun määrät on laskettu eri perustein, jolloin laskelmien tulosten välillä on ristiriitoja (vertaa Calvert ym. 1986 ja National Research Council ym. 1995 s. 14).

SDS-rehu on R3-rehua huomattavasti rasvaisempaa. Rasvaisesta rehusta poikaset saavat runsaasti energiaa kasvuun ja kehitykseen jo ennen vierotusta, ja rasva saattaa vaikuttaa myös emon maidon määrään ja laatuun edullisesti. Knapkan tutkimusryhmä oli saanut rasvaa lisäämällä poikueiden vierotuspainon kasvamaan myös joillakin sisäsiittoisilla kannoilla. Etenkin rasvan ja proteiinin suhde on poikasten kasvun kannalta erityisen tärkeä (Knapka ym. 1977), ja SDS:ssä rasvaprosentti on suurempi kuin R3:ssa juuri huonosti lisääntyvien kantojen erityistarpeiden vuoksi.

Autoklavoiminen voi tuhota R3 -rehun K-vitamiinia (Poole 1999). Taulukon 1 mukaan K1- ja K3-vitamiineja on molempia lisätty SDS -rehuun 60 kansainvälistä yksikköä (IE)/kg, kun R3 -rehuun on lisätty vain 0,25 IE/kg K1-vitamiinia ja 10 IE/kg K3-vitamiinia. Lisäksi autoklavoinnin tiedetään vähentävän rehun A- ja B1-vitamiineja (Hedrich 2006), mutta A-vitamiinia on molemmissa rehuissa ylen määrin (taulukko 1). Sitä vastoin B1-vitamiinia R3 -rehuun on lisätty vain 3 IE/kg, kun SDS -rehuun sitä on lisätty jopa 25 IE/kg. Rehussa B1-vitamiinia tulisi suositusten mukaan olla 1700 IE/kg, mutta SDS- ja R3- rehujen sisältämän B1-vitamiinin kokonaismäärä ei ole tiedossa. Lisäksi American Institute of Nutrition (1977) on todennut, että 2000 IE/kg B1-vitamiinia rehussa on riittänyt ylläpitämään normaalia kasvua ja lisääntymistä useissa hiirikolonioissa.

Molemmat rehut autoklavoidaan ennen kuin ne tuodaan SPF -tason barrieriin, joten voisi olettaa, että autoklavointi on huomattavasti vähentänyt molempien rehujen vitamiinipitoisuuksia. Tällöin etenkin K-vitamiinia saattaa olla R3 -rehussa hyvin vähän. A-vitamiinin puute johtaa heikentyneeseen immuunipuolustukseen (National Research Council ym. 1995) ja K-vitamiinin puute voi johtaa luuston kasvuhäiriöihin ja sitä kautta heikentää yksilön kasvua (Hara ym. 2002; Iwamoto ym. 2003). B1 vitamiinin puute voi johtaa heikkoon kasvuun ja varhaiseen kuolleisuuteen (Jones ym. 1945; Morris & Dubnik 1947, National

Research Council ym. 1995 mukaan). Vitamiinien tuhoutuminen autoklavoitaessa voi siis osaltaan myös selittää SDS -rehun positiivista vaikutusta poikasten kasvuun.

Lähes kaikkia vitamiineja on lisätty SDS-rehuun huomattavasti enemmän kuin R3:een. SDS:n tuoteselosteen mukaan vitamiinit parantavat lisääntymistä, mitä tämä tutkimus tosin ei vahvistanut. Tiedetään, että harva vesiliukoinen vitamiini aiheuttaa toksisia sivuvaikutuksia suurina annoksina. Koliini voi aiheuttaa kuolioita lihassoluihin, mutta sitä SDS:ssä on paljon vähemmän kuin R3:ssa (National Research Council ym. 1995). Näillä perusteilla SDS:n voisi olettaa muutenkin kuin vain rasvan määrän perusteella olevan geenimuunneltujen hiirenpoikasten kasvun kannalta perinteistä R3-rehua parempaa.

6.4. Paritusstrategian vaikutus lisääntymiseen

Kirjallisuuskatsauksessa todettiin, että paritusstrategian valinnalla voidaan vaikuttaa poikastuotantoon. Tässä tutkimuksessa käytettiin kolmea erilaista paritusstrategiaa. B6 -hiirikannan siitosparit olivat jatkuvassa parituksessa niin, että uros oli mukana häkissä myös silloin, kun naaras oli kantavana ja poikaset olivat syntyneet. APP -urokset poistettiin heti, kun naaraan havaittiin olevan kantavana ja uros palautettiin vasta, kun poikaset oli vierotettu. ApdE9 -urokset pysyivät häkissä, sillä niillä oli kahdesta kolmeen naarasta, jotka poistettiin kun ne olivat kantavina. Naaraat palautettiin häkkiin vasta sitten, kun niiden poikaset oli vierotettu. ApdE9 -uros joutui kuitenkin olemaan yksin, jos kaikki naaraat oli poistettu häkistä.

Jatkuva paritus, jossa uros on koko ajan häkissä, voi hyödyntää post partum -kiiman, eli uros voi astua ja saada naaraan kantavaksi heti synnytyksen jälkeen. Uroksen läsnäolon synnytyksessä tiedetään kuitenkin alentavan poikasten mahdollisuutta elää vierotusikäisiksi (Hedrich 2006). Lisäksi tämä paritusstrategia vaatii paljon uroksia, mikä ei välttämättä ole mahdollista muuntogeenisillä kannoilla. Haaremparitus on toimiva B6 -hiirikannan tuotannossa.

APP -urokset otettiin pois häkistä naaraan kanto- ja imetysajaksi. Uros siis joutui olemaan yksin jopa kuukauden, ennen kuin se palautettiin naaraan kanssa samaan häkkiin. Sosiaalinen

eristys ei kuitenkaan ole hiirille hyväksi, sillä se aiheuttaa stressiä (Hedrich 2006). Eristetyt hiiret ovat myös takaisin ryhmään joutuessaan aggressiivisempia kuin ennen eristystä ja eristyksissä pidettyjen hiirten immuunipuolustus heikentyy (Wu ym. 2001). Uroksen poistamisella koetetaan estää myös uroksesta johtuvaa kannibalismia, mutta kuten edellä jo todettiin, ei uroksen poistaminen häkistä poistanut poikashävikkiä, joten syynä ei ollut urosten aikaansaama aggressiivisuus. Lisäksi tämä paritusstrategia vie vielä enemmän tilaa kuin jatkuva paritus, sillä välillä naaraat ja urokset tarvitsevat kaksi häkkiä. Tämä paritusstrategia ei myöskään hyödynnä post partum -kiimaa.

ApdE9 -hiirikannan urokset joutuivat harvoin olemaan pitkiä aikoja yksin, sillä niillä oli useita naaraita, ja vaikka Whittenin efekti saakin naaraitten kiimakierron synkronisoitumaan, oli yksi naaras usein jo palaamassa uroksen luo kun toinen naaras poistettiin synnyttämään. Tämän tutkimuksen aikana naaraat eristettiin toisistaan synnytyksen ja imetyksen ajaksi, jotta niiden poikaset voitiin erottaa toisistaan, mutta normaalisti ApdE9 -urosten naaraat saivat olla samassa häkissä kasvattamassa poikasiaan. Vaikka naaraat saattavatkin joskus olla aggressiivisia toisten naaraitten poikasia kohtaan (Hedrich 2006), on myös yleistä, että naaraat hoitavat yhdessä toistensa poikasia (Whitaker ym. 2007) ja näin saavat aikaan suuremman määrän vierotettuja poikasia kuin yksittäiset naaraat (Manning ym. 1995).

Koska tämän tutkimuksen aikana havaittiin uroksen poistamisesta huolimatta paljon kannibalismia, olisi hyvä tutkia erikseen, kannattaako sittenkin pitää APP- ja ApdE9 -urokset jatkuvasti häkissä naaraitten ja poikasten kanssa. Urokset kuitenkin harvoin syövät omia poikasiaan (Priestnall & Young 1978), ja poikastuotanto voisi jopa kasvaa, kun post partum -kiima voitaisiin hyödyntää. Myös tilankäyttö järkevöityisi. Lisäksi jatkuva paritus lisäisi mahdollisesti urosten hyvinvointia. Useiden paritusstrategioiden yhtäaikainen käyttö tässä tutkimuksessa vaikeuttaa eri hiirikantojen poikastuotannon tulosten vertailua, mutta eri tutkimuksessa käytettyjen hiirikantojen yleisesti käytettyjä paritusstrategioita ei haluttu muuttaa.

6.5. Ympäristötekijöiden vaikutukset muuntogeenisten hiirten fenotyyppiin

Fenotyyppi on genotyypin ja ympäristön vuorovaikutusten summa (Blewitt ym. 2004). Monet ympäristön tekijät siis vaikuttavat kunkin hiiren yksilölliseen kasvuun ja kehitykseen, ei pelkästään perimä. Ympäristötekijöitä ovat muun muassa sosiaaliset tekijät, ravinto, valo, äänet ja niin edelleen (Latham & Mason 2004). Elämän alkuvaiheet ovat hiirten kehityksen kannalta tärkeitä, koska erot hoitotoimenpiteissä, emon stressin tasossa, vierotusikäisten poikasten kehityksen tasossa ja erot ympäristössä ylipäättään tuottavat hiiriä, jotka keskenään eroavat fenotyypiltään, vaikka niiden genotyyppi olisi identtinen. Nämä erot puolestaan tuottavat eri hiirillä ja hiiripopulaatioilla erilaisia tutkimustuloksia. Niinpä tässäkin tutkimuksessa rehun vaihdon aiheuttamat erot poikasten ravinnossa ja sitä kautta varhaiskehityksessä voivat tuottaa aikuisia hiiriä, joiden fenotyyppi eroaa suuresti R3 -rehulla ruokituista saman hiirikannan yksilöistä.

Toisaalta, vaikka kyse onkin vierotuksen aikaistumisesta vain yhdellä viikolla, voi ajansäästöllä olla suuri rahallinen merkitys, jos hiiriä tuotetaan monilla siitospareilla tai -ryhmillä ja jos niitä joudutaan kasvattamaan vielä vierotuksen jälkeen ennen kuin ne ovat tarpeeksi vanhoja tutkimuskäyttöön. Tässä tutkimuksessa SDS -rehu osoittautui R3 -rehua paremmaksi ensiravinnoksi kasvaville ja kehittyville poikasille. Jos hiirten nopea kehitys johtaa aikaiseen Alzheimerin taudin oireiden kehittymiseen, voi ajansäästöllä olla huomattava taloudellinen merkitys.

6.6. Muita mahdollisuuksia parantaa hiirten lisääntymistä

Usein jo pelkkiä ympäristöolosuhteita käytännön tasolla muokkaamalla voitaisiin parantaa hiirten lisääntymistä. Ne eläinhuoneet, joissa geenimuunneltuja hiirikantoja pidetään siitoksessa, ovat joskus hyvin ahtaita, koska geenimuunneltuja hiirikantoja on hyvin paljon ja käytettävissä olevat tilat ovat rajoitetut. Näin oli ainakin tämän tutkimuksen aikana käytetyissä eläinhuoneissa. Ahtaissa huoneissa on usein meluisaa, koska jo pelkkien häkkitelien siirtely ahtaassa tilassa aiheuttaa paljon ääntä metallisten telineiden osuessa toisiinsa. Meluista ympäristö saattaa aiheuttaa stressiä, ja stressi on sisäeritysjärjestelmän

kautta yhteydessä myös lisääntymishormonien eritykseen ja näin ollen myös lisääntymiskäyttäytymisen säätelyyn (Hedrich 2006). Poikasten syönte on yleinen stressin oire hiiriemoilla, joten kovien äänten ja sitä kautta emojen stressin vähentäminen voisi johtaa lopulta parempiin lisääntymistuloksiin, kun poikasia saataisiin vierotettua nykyistä enemmän.

7. LÄHTEET

- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 144: 42-49.
- Anthony A, Ackerman E, Lloyd JA, 1959. Noise stress in laboratory rodents I. Behavioral and endocrine response of mice, rats and guinea pigs. *J Acoust Soc Am* 31: 1430-1437.
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK & Steiner RA, 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137: 3144-3147.
- Blewitt ME, Chong S & Whitelaw E, 2004. How the mouse got its spots. *Trends Genet* 20: 550-554.
- Borchelt DR, Ratovitski T, Van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jankins NA, Copeland NG, Price DL & Sisodia SS, 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19: 939-945.
- Bosshardt DK, Paul WJ, O'Doherty K & Barnes RH, 1948. Caloric restriction and protein metabolism in the growing mouse. *J Nutr* 36: 773-783.
- Calvert CC, Famula TR, Bernier JF, Khalaf N & Bradford GE, 1986. Efficiency of growth in mice with a major gene for rapid postweaning gain. *J Anim Sci* 62: 77-85.
- Capecchi MR, 1989. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5: 70-76.
- Chapman JC, Christian JJ, Pawlikowski MA & Michael SD, 1998. Analysis of steroid hormone levels in female mice at high population density. *Physiol Behav* 64: 529-533.
- Chovnik A, Yasukawa NJ, Monder H & Christian JJ, 1987. Female behavior in populations of mice in the presence and absence of male hierarchy. *Aggress Behav* 13: 367-375.
- Coluccia A, Tattoli M, Bizzoca A, Arbia S, Lorusso L, De Benedictis L, Buttiglione M, Cuomo V, Furley A, Gennarini G & Cagiano R, 2004. Transgenic mice expressing F3/contactin from the transient axonal glycoprotein promoter undergo developmentally regulated deficits of the cerebellar function. *Neuroscience* 123: 155-166.
- Contet A, Rawlins JNP & Deacon RMJ, 2001. A comparison of 129S2/SvHsd and C57BL/6J OlaHsd mice on a test battery assessing sensorimotor, affective and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice. *Behav Brain Res* 124: 33-46.
- Crawley JN & Paylor R, 1997. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 31: 197-211.
- de Boer J, Anderssoo JO, de Wit J, Hujimans J, Beems RB, van Steeg H, Weeda G, van de Horst GTJ, van Leeuwen W, Themmen APN, Meradji M & Hoeijmakers JHJ, 2002: Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 296: 1276-1279.
- Eskola S & Kaliste-Korhonen E, 1999. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice. *Lab Anim* 33: 122-128.
- Ford DJ, 1977. Influence of diet pellet hardness and particle size on food utilization by mice, rats and hamsters. *Lab Anim* 11: 241-246.

- Gerlai R, 1996. Gene-targeting studies of mammalian behaviour: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* 19: 177-181.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA & Ruddle FH, 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7380-7384.
- Green EL (toim.), 1966. *Biology of the laboratory mouse*. 2. painos. 706 s. Dover Publications, INC., New York, USA.
- Green EL, 1981. *Genetics and probability in animal breeding experiments : a primer and reference book on probability, segregation, assortment, linkage and mating systems for biomedical scientists who breed and use genetically defined laboratory animals for research*. 271 s. Oxford University Press, New York, USA.
- Grüneberg H, 1943. *The genetics of the mouse*. 412 sivua. Cambridge University Press, London, UK.
- Hara K, Kobayashi M & Akiyama Y, 2002. Vitamin K₂ (menatetronone) inhibits bone loss induced by prednisolone partly through enhancement of bone formation in rats.
- Hedrich HJ (toim.), 2006. *The laboratory mouse*. 2. painos. 600 s. Elsevier Ltd., London, UK.
- Hurley LS, Cosens G & Theriault LL, 1976. Teratogenic effects of magnesium deficiency in rats. *J Nutr* 106: 1254-1260.
- Iwamoto J, Yeh JK, Takeda T, Ichimura S & Sato Y, 2003: Comparative effects of vitamin K and vitamin D supplementation on prevention of osteopenia in calcium-deficient young rats. *Bone* 33: 557-566.
- Jones JH, Foster C, Dorfman F, Hunter GL, Quinby ME & Alexander DL, 1945. Effects on the Albino Mouse of Feeding Diets Very Deficient in Each of Several Vitamin B Factors (Thiamine, Riboflavin, Pyridoxine and Pantothenic Acid). *J Nutr* 29: 127-136.
- Knapka JJ, Smith KP & Judge FJ, 1977. Effect of crude fat and crude protein on reproduction and weanling growth in four strains of inbred mice. *J Nutr* 107: 61-69.
- Koopman JP, Scholten PM, Roeleveld PC, Velthuisen YW & Beynen AC, 1989. Hardness of diet pellets and its influence on growth of pre-weaned and weaned mice. *Z Versuchstierkd* 32: 71-75
- Latham, N & Mason G, 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci* 86: 261-289.
- McCarthy MM & Vom Saal FS, 1985. The influence of reproductive state on infanticide by wild female house mice (*Mus musculus*). *Physiol Behav* 55: 317-321.
- Manning CJ, Dewsbury DA, Wakeland EK & Potts WK, 1995. Communal nesting and communal nursing in house mice, *Mus musculus domesticus*. *Anim Behav* 50: 741-751.
- Marchlewska-Koj A, Pochron E, Galewicz-Sojecka A & Galas J, 1994. Suppression of estrus in female mice by the presence of conspecifics or by foot shock. *Physiol Behav* 55: 317-321.
- Marchlewska-Koj A, 1997: Sociogenic stress and rodent reproduction. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 699-703.
- Molina V, Medici M, Taranto MP & Font de Valdez G, 2008. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 62: 162-168.
- Morris HP & Dubnik CS, 1947. Thiamine deficiency and thiamine requirements of C₃H mice. *J Natl Cancer Inst* 3: 479-489.
- Morrissey RE, Collins JJ, Lamb JC IV, Manus AG & Gulati DK, 1988. Reproductive effects of theophylline in mice and rats. *Fundam Appl Toxicol* 10: 525-536.

- Nagai J, Lin CY & Sabour P, 1993. Selection for increased adult body weight in mouse lines with and without the rat growth hormone transgene. *J Anim Breed Genet* 110: 374-384.
- National Research Council, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition & Board on Agriculture, 1995: Nutrient requirements of laboratory animals. 4. painos. 192 s. National Academy Press, Washington D.C, USA.
- Nawrot PS, Cook RO & Staples RE, 1980. Embryotoxicity of various noise stimuli in the mouse. *Teratology* 22: 279-289.
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M & Illgen-Wilcke B, 2002. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36: 20-42.
- Nojima K, Ikegami H, Fujisawa T, Ueda H, Babaya N, Itoi-Babaya M, Yamaji K, Shibata M & Ogihara T, 2006. Food hardness as environmental factor in development of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 74: 1-7.
- O'Brien C & Holmes M, 1993. The mouse (part 1 of 2 parts). Moniste. 4 s. Anzccart Facts Sheet. The University of Adelaide, Thebarton, Australia.
- Poltyrev T, Keshet GI, Kay G & Weinstock M, 1996. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol* 29: 453-462
- Poole TB (toim.), 1987. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 6. painos. 933 s. Longman Scientific & Technical, London, UK.
- Poole TB (toim.), 1999. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7 painos. 840 s. Blackwell science Ltd, London, UK.
- Priestnall R & Young S, 1978. An observational study of caretaking behaviour of male and female mice housed together. *Dev Psychobiol* 11: 23-30.
- Rogers EH, Hunter ES, Rosen MB, Rogers JM, Lau C, Hartig PC, Francis BM & Chernoff N, 2003. Lack of evidence for intergenerational reproductive effects due to prenatal and postnatal undernutrition in the female CD-1 mouse. *Reprod Toxicol* 17: 519-525.
- Röykkönen A, Kukkonen JVK & Nieminen P, 2006. Effects of dietary genistein on mouse reproduction, postnatal development and weight-regulation. *Anim Reprod Sci* 93: 337-348.
- Silver LM, 1995. Mouse genetics : concepts and applications. 362 s. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE & Sharp JJ, 1997. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 16: 19-27.
- Simpson ER, 1998. Genetic mutations resulting in estrogen insufficiency in the male. *Mol Cell Endocrinol* 145: 55-59.
- Smithies O, 1993. Animal models of human genetic diseases. *Trends Genet* 9: 112-116.
- Strauss L, Mäkelä S, Joshi S, Huhtaniemi I & Santti R, 1998. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 144: 83-93.
- Tanaka T, 1998. Effects of litter size on behavioral development in mice. *Reprod Toxicol* 12: 613-617.
- Troelson JE & Bell JM, 1963. A comparison of nutritional effects in svine and mice: responses in feed intake, feed efficiency and carcass characteristics to similar diets. *Can J Anim Sci* 43: 294-304.
- Tsai PS, Nielen M, van der Horst GTJ, Colenbrander B, Heesterbeek JAP & Fentener van Vlissingen JM, 2005: The effect of DNA repair defects on reproductive performance in nucleotide excision repair (NER) mouse models: an epidemiological approach. *Transgenic Res* 14: 845-857.

- van der Meer M, Baumans V, Hofhuis FMA, Olivier B & van Zutphen BFM, 2001: Consequences of gene targeting procedures for behavioural responses and morphological development of newborn mice. *Transgenic Res* 10: 399-408.
- Vloeberghs E, Van Dam D, Engelborghs S, Nagels G, Staufenbiel M & De Deyn PP, 2004. Altered circadian locomotor activity in APP23 mice: a model for BPSD disturbances. *Eur J Neurosci* 20: 2757-2766.
- Wang J, Ikonen S, Gurevicius K, van Groen T & Tanila H, 2002. Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene. *Brain Res* 943: 181-190.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Brent MR, Collins FS, Guigo R, Hardison RC, Haussler D, Jaffe DB, Kent WJ, Miller W, Ponting CP, Smit A, Zody MC & Lander ES, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562.
- Whitaker J, Moy SS, Saville BR, Godfrey V, Nielsen J, Bellinger D & Bradfield J, 2007. The effect of cage size on reproductive performance and behaviour of C57BL/6 mice. *Lab Anim Eur* 37: 16-25.
- Wiebold JL, Stanfield PH, Becker WC & Hillers JK, 1986. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 78: 185-192.
- Wu W, Murata J, Hayashi K, Yamaura T, Mitani N & Saiki I, 2001. Social isolation stress impairs the resistance of mice to experimental liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 24: 772-776.
- Zhang Y, Proenca R, Maffel M, Barone M, Leopold M, & Friedman JM, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zorrilla EP, Brennan M, Sabino V, Lu X & Bartfai T, 2007. Galanin type 1 receptor knockout mice show altered responses to high fat diet and glucose challenge. *Physiol Behav* 91: 479-485.