



Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologii

Sylwia Buczyńska

**Test hipotezy o ograniczeniach w rozpraszaniu ciepła
u myszy laboratoryjnych o różnym tempie metabolizmu**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Aneta Książek

Białystok 2023 rok



Badania przedstawione w mojej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego o numerze 2016/21/B/NZ8/02491 (konkurs OPUS 11). Byłam stypendystką w projekcie.

Analizy z wykorzystaniem techniki podwójnie znakowanej wody wykonane były przy współpracy ze specjalistycznym laboratorium na Uniwersytecie w Aberdeen (Szkocja).

Spis treści

Streszczenie	4
Summary.....	7
1. Wstęp.....	10
2. Wpływ golenia na wysiłek reprodukcyjny samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)	23
2.1. Materiały i metody.....	24
2.2. Rezultaty.....	31
2.3. Dyskusja.....	41
2.4. Tabele i ryciny	46
3. Kompromis między wysiłkiem reprodukcyjnym a reakcją obronną u samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)	61
3.1. Materiały i metody.....	64
3.2. Rezultaty.....	68
3.3. Dyskusja.....	77
3.4. Tabele i ryciny	82
4. Łączny wpływ golenia i immunizacji na wysiłek reprodukcyjny samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)	100
4.1. Materiały i metody.....	101
4.2. Rezultaty.....	104
4.3. Dyskusja.....	112
4.4. Tabele i ryciny	116
5. Dyskusja ogólna.....	133
6. Spis literatury	138

Streszczenie

Hipoteza HDL (ang. *Heat Dissipation Limitation Hypothesis*) zakłada, że budżety energetyczne zwierząt są ograniczane przez zdolność do rozpraszania ciepła powstającego jako produkt uboczny procesów metabolicznych. Zgodnie z teorią historii życiowych, jednym z kluczowych cykli, stanowiących istotne obciążenie wydatków energetycznych wśród zwierząt jest rozród. Dlatego też, dotychczasowe testowanie założeń hipotezy HDL, opierało się przede wszystkim na manipulacji gradientem temperatur pomiędzy organizmem a jego otoczeniem z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, jakie stanowiły małe ssaki w okresie laktacji.

W swojej pracy proponuję nowe podejście do badań nad ograniczeniami w rozpraszaniu ciepła, polegające na włączeniu idei kompromisów energetycznych. Zakładałam, że jeśli przypuszczenia hipotezy HDL są prawdziwe, dodatkowe obciążenie budżetów laktujących zwierząt kosztami odpowiedzi immunologicznej przybliży matki do ich górnej granicy zdolności do rozpraszania ciepła, a w konsekwencji do ujawniania się kompromisów między tymi funkcjami. Jako model badawczy wykorzystałam linie myszy laboratoryjnych, sztucznie selekcjonowane w kierunku wysokiego (H-BMR) i niskiego (L-BMR) tempa metabolizmu podstawowego. Model ten idealnie wpasowuje się w założenia badanego przeze mnie problemu z uwagi na ponad 50% międzyliniową różnicę w BMR, nie pociągającą za sobą zmian w przewodności cieplnej. Co więcej, myszy z linii H-BMR charakteryzują się istotnie większą konsumpcją pokarmu, masą narządów wewnętrznych, temperaturą ciała oraz budują silniejszą odpowiedź immunologiczną przeciwko antygenowi KLH w porównaniu do myszy z linii L-BMR.

Aby przetestować ujawnianie się kompromisów pomiędzy opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną, przeprowadziłam trzy komplementarne eksperymenty. W każdym z nich, samice myszy laboratoryjnych pochodzące z dwóch różnych linii selekcyjnych, podczas 14-dniowego okresu laktacji, poddałam działaniu dwóch temperatur otoczenia tj. temperaturze 23°C (stanowiącej warunki kontrolne) oraz temperaturze 30°C, ograniczającej zdolność matek do rozpraszania ciepła. W czasie laktacji kontrolowałam masę i temperaturę ciała samic, ilość spożywanego pokarmu, jego strawność oraz poziom wysiłku rodzicielskiego, oceniany jako tempo przyrostu masy miotu. W szczytowym punkcie laktacji (w moim modelu badawczym jest to okres

między 12 a 14 dniem), oceniłam ilość asymilowanej przez matki energii, kaloryczność produkowanego przez nie mleka oraz poziom ich dziennych wydatków energetycznych. Matki zostały uśmiercone w 14 dniu laktacji, a ich narządy wewnętrzne aktywne metaboliczne oraz limfatyczne (serce, wątroba, nerki, jelito cienkie, brunatna tkanka tłuszczowa, grasicca, śledziona i węzły chłonne pachwinowe) zostały zważone i zabezpieczone. W 14 dniu laktacji oceniłam także odpowiedź immunologiczną matek, której miarą był poziom swoistych przeciwciał anty-KLH IgM.

W Eksperymentcie 1 laktujące samice były golone w 6 i 10 dniu laktacji w celu podniesienia ich zdolności do oddawania ciepła. Zakładałam, że matki z usuniętą sierścią, poddane ekspozycji do wysokiej temperatury otoczenia, będą wychowywać szybciej przyrastające mioty w stosunku do matek niegolonych, przy czym wzrost ten będzie zależał od linii selekcyjnej. Wyniki pokazały, że zgodnie z moimi założeniami, ekspozycja samic z linii H-BMR do 30°C ograniczyła ich wysiłek rodzicielski, pozytywny wpływ golenia na tempo przyrostu masy miotów w obrębie tej linii był zauważalny jedynie w temperaturze 23°C. Mioty matek z linii L-BMR przyrastały szybciej w 30°C niż w warunkach kontrolnych, ich wysiłek reprodukcyjny był wyższy w porównaniu do matek z wysokim BMR, nawet bez istotnego efektu golenia.

W Eksperymentcie 2 testowałam reakcję samic z przeciwnych linii selekcyjnych na jednoczesne obciążenie ich budżetów energetycznych kosztami opieki rodzicielskiej i reakcji obronnej. Zakładałam, że jeśli zdolność do rozpraszania ciepła jest czynnikiem ograniczającym tempo wydatkowania energii, matki ujawnią kompromisy pomiędzy dwoma zastosowanymi obciążeniami, a ich nasilenie będzie różne w zależności od przynależności do linii selekcyjnej. Tak jak się spodziewałam, samice o różnym BMR inaczej zareagowały na poddanie ich manipulacjom eksperymentalnym. Matki z linii L-BMR, laktujące w obu temperaturach otoczenia, dały priorytet reprodukcji i nie rozpoczęły produkcji przeciwciał anty-KLH. Samice z linii H-BMR, pomimo większych kosztów utrzymania organizmu, w 23°C rozpoczęły produkcję przeciwciał, a ich mioty przyrastały szybciej w porównaniu do matek z niskim tempem metabolizmu. W temperaturze 30°C matki z wysokim BMR dały początkowo priorytet reprodukcji, a budowanie kompromisów rozpoczynały w ostatnich dniach laktacji, o czym świadczy wzrost masy narządów limfatycznych i spadek tempa przyrostu masy miotu w szczycie laktacji.

Eksperyment 3 miał na celu testowanie ujawniania się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną przy jednoczesnym braku ograniczeń związanych z rozpraszaniem ciepła, poprzez usunięcie samicom warstwy izolacyjnej. Spodziewałam się, że matki z usuniętą sierścią będą w stanie realizować dwie kosztowne energetycznie funkcje fizjologiczne. Przeciwnie do moich założeń, uzyskane wyniki pokazały, że matki z przeciwnych linii selekcyjnych, zarówno w 23°C, jak i 30°C, dały priorytet reprodukcji i nie uruchomiły mechanizmów swoistej odpowiedzi immunologicznej w postaci produkcji przeciwciał. Ponadto, przeciwnie do moich założeń, mioty matek golonych przyrastały w podobnym tempie do miotów matek niegolonych Eksperymencie 2.

Zebrane wyniki pokazały, że samice myszy laboratoryjnych różniące się tempem metabolizmu podstawowego mają inny schemat odpowiedzi na jednoczesne obciążenie ich budżetów energetycznych kosztami reprodukcji i budowania odpowiedzi immunologicznej. Matki z niskim BMR dały priorytet reprodukcji w obu temperaturach otoczenia, natomiast samice z wysokim BMR budowały kompromisy między dwiema funkcjami, które różniły się natężeniem w zależności od temperatury otoczenia. Powyższe wyniki nie dostarczyły poparcia dla założeń hipotezy HDL, jak również pokazały, że sierść jako warstwa izolacyjna nie stanowi większej przeszkody w rozpraszaniu ciepła w moim modelu badawczym.

Summary

The heat dissipation limitation hypothesis (HDL) suggests that animals' energy budgets are limited by the ability to dissipate body heat to avoid detrimental overheating. According to the life history theory, reproduction is one of the key cycles that constitute a significant burden of animals energy budgets. Therefore, testing of the HDL hypothesis assumptions is primarily based on the manipulation of the temperature gradient between the organism and its environment, mainly in small mammals during the lactation period.

In my work, I propose a new approach to test the HDL hypothesis, based on the incorporation of the energy trade-offs idea. I assumed that, if the HDL hypothesis is correct, additional burden of lactating mother mice with costs of the immune response, should bring dams to upper limits to dissipation of metabolic heat and lead to trade-offs between parental effort and immune response. As an experimental model, I have used laboratory mice selected divergently towards either high and low level of basal metabolic rate (respectively H-BMR and L-BMR line types). This model perfectly fits to the assumptions of the HDL hypothesis due to the interlinear difference in basal metabolism rate at level about 50% and no changes in thermal conduction. Moreover, mice with high basal metabolism rate consume more food, have higher masses of internal organs, maintain higher body temperature and produce more specific antibodies in response to KLH antigen in comparison to the L-BMR line type.

To test the trade-offs between parental effort and an immune response, I have conducted three complementary experiments. In each of them, females of laboratory mice from H-BMR and L-BMR line types for 14 days of lactation period were exposed to two different ambient temperature: 23°C, posing a control environment and 30°C, restricting dams ability to heat dissipation. During lactation, I have controlled dams body mass and body temperature, food consumption, digestibility and the parental effort, measured as a ratio of litter mass growth. At the peak of the lactation (in my experimental model is a period between 12 and 14 days), I have measured the metabolisable energy intake, milk energy output and daily energy expenditures of experimental dams. All mice were sacrificed at 14 day after parturition, when I have

collected and weighed their metabolic and lymphatic organs (heart, liver, kidneys, small intestine, brown adipose tissue, thymus, spleen and lymph nodes). Also at 14 day of lactation I have measured the level of anti-KLH IgM antibodies, as a proxy for the immune response.

At the 1st experiment, lactating females were shaved at 6th and 10th day of lactation, to increase their ability to dissipate heat. I have assumed that litters of dams with removed fur, exposed to 30°C will grow faster than litters of unshaved dams, but this realizing effect of shaving will depend from the line type. Results showed, that in accordance to my assumptions, exposure of mice from H-BMR line type to 30°C reduced their parental effort but realizing effect of shaving to litter mass growth was noticeable only at 23°C. L-BMR line type litters grew faster at 30°C than at control condition, their reproductive effort was higher in comparison to H-BMR line type, even without shaving effect.

At the 2nd experiment, I have tested the reaction of females from both line types to the simultaneous burdening their energetic budgets with the costs of the parental effort and immune response. I have assumed that if the capacity to dissipate body heat is a factor limiting rate of energy expenditures, dams will reveal the trade-offs between both functions and the severity of trade-offs will be dependent from line type. As I have expected, mice from both line types responded divergently to experimental manipulations. Dams with low BMR lactating at both ambient conditions, gave the priority to reproduction and did not start the production of anti-KLH antibodies. Moreover, their litters grew faster compared to dams from H-BMR line type. Despite the higher maintenance costs observed in mice from H-BMR line type, at temperature of 23°C females from this line type have started production of anti-KLH antibodies and their litters grew faster than L-BMR line type litters. At 30°C, mice with high BMR, gave the priority to reproduction in the beginning of lactation, but in the last days of experiment, they have started to reveal the trade-offs, which were manifested by increase of lymphatic organs masses and decreased litter mass growth at the peak of lactation.

The 3rd experiment was designed to test the trade-offs between reproduction and immune response in mice revealed from constraints with heat dissipation (shaving procedure). I have assumed that shaved mice will be able to combine maintaining two

energy costly functions. Contrary to my predictions, results showed that mice from different line types, at both temperatures, gave the priority to reproduction and did not build the mechanisms of specific immune response, measured as a specific antibodies level. Moreover, against to my assumptions, litters of shaved mice grew in similar rate as litters of unshaved dams at 2nd Experiment.

The obtained results showed that laboratory mice with high and low basal metabolism rate present a different pattern in response to simultaneous burdening of their energy budgets with costs of reproduction and immune response. Mice with low BMR gave the priority to reproduction at both ambient conditions, whereas dams with high BMR built the trade-offs between both functions in temperature-dependent manner. The above results did not provide the support to assumptions of the HDL hypothesis. Moreover, results suggests that fur as an insulating layer is not a main obstacle in heat dissipation in my experimental model.

1. Wstęp

Czynniki limitujące maksymalne tempo przetwarzania energii przez zwierzęta (ang. *The Sustainable Maximum Metabolic Rate*; SuSMR) od dawna stanowią przedmiot badań biologów ewolucyjnych. Identyfikacja czynników, limitujących maksymalne wydatki energetyczne jest istotna, ponieważ to od dostępności energii zależy realizacja funkcji życiowych, takich jak np. przeżywalność, wydolność reprodukcyjna czy zdolność do termoregulacji (Johnson i in. 2001ab, Król i Speakman 2007, Wu i in. 2009, Zhao i in. 2010a, Speakman i Król 2011, Vaanholt i in. 2013, Zhao i in. 2020b).

Początkowo sądzono, że SuSMR warunkowane jest przede wszystkim dostępnością pokarmu w środowisku. Liczne badania prowadzone na ptakach i małych ssakach nie wykazały jednak podwyższonej konsumpcji pokarmu przy eksperymentalnym zwiększeniu jego dostępności, działania te skutkowały natomiast zmniejszaniem terenu żerowania lub wcześniejszym rozpoczynaniem sezonu rozrodczego (Boutin 1990, Akbar i Gorman 1993, Gorman i Ahmad 1993, Meijer i Drent 1999). Wyniki uzyskane w powyższych badaniach sugerowały, że limity w tempie przetwarzania energii wynikają raczej z ograniczeń fizjologicznych zwierząt, a nie z ilości energii dostępnej w środowisku (przegląd w Speakman i Król 2005a).

Czynniki fizjologiczne, które mogą ograniczać maksymalne tempo przetwarzania energii mają kluczowe znaczenie w okresie laktacji. Czas karmienia i opieki nad potomstwem to najbardziej energochłonny okres w życiu samic. W okresie laktacji matki nawet dwukrotnie zwiększają spożycie pokarmu, co wiąże się z podwyższeniem tempa ich metabolizmu oraz podniesieniem temperatury ciała (np. Speakman i Król 2005a, Zhang i Wang 2007, Paul i in. 2010, Gamo i in. 2013b, Sadowska i in. 2016). Dlatego też badania, których celem było poszukiwanie czynników ograniczających indywidualne maksymalne tempo przetwarzania energii, opierają się głównie na wykorzystaniu modeli zwierzęcych w okresie laktacji (Król i Speakman 2003ab, Król i in. 2007, Wu i in. 2009, Duah i in. 2013, Vaanholt i in. 2013, Valencak i in. 2013, Zhao i in. 2013ab oraz 2016, Gamo i in. 2016, Sadowska i in. 2016, Bao i in. 2020, Deng i in. 2020, Huang i in. 2020, Zhao i in. 2020b).

Przez lata testowano kilka hipotez sugerujących czynniki, które limitują maksymalne tempo przetwarzania energii. Najczęściej dyskutowano w literaturze

hipotezę o centralnych (ang. *Central Limitation Hypothesis*) lub peryferycznych (ang. *Peripheral Limitation Hypothesis*) czynnikach ograniczających maksymalne tempo wydatkowania energii. Zgodnie z założeniami pierwszej hipotezy, SuSMR ograniczany jest przez zdolność układu pokarmowego do pobierania pokarmu i pozyskiwania z niego energii (Weiner 1989, Peterson i in. 1990, Weiner 1992). Przypuszczenia te zostały zilustrowane badaniami, w których Hammond i Diamond (1992) manipulowali wielkością miotów wychowywanych przez myszy laboratoryjne szczepu Swiss Webster. Okazało się, że matki karmiące mioty składające się z 23 osesków (wielkość miotu prawie dwukrotnie większa w porównaniu do średniej wielkości miotu w tym modelu zwierzęcym), nie były w stanie zwiększyć ilości konsumowanego pokarmu powyżej określonego wcześniej limitu. Podobny wynik dał eksperyment, w którym myszy laboratoryjne szczepu MF1, wychowujące powiększone doświadczalnie mioty, nie przekroczyły dziennego limitu konsumpcji pokarmu, obserwowanego u miotów niemanipulowanych (Johnson i in. 2001a). Druga z hipotez zakłada natomiast, że limity w wielkości SuSMR związane są z wydolnością fizjologiczną tkanek, w których energia jest przetwarzana. W związku z tym, produkcja mleka w okresie laktacji może być ograniczona poprzez wydolność gruczołów mlecznych. Założenia hipotezy o ograniczeniach obwodowych zostały poparte rezultatami przedstawionymi w pracy Hammond i współautorów (1996). Zgodnie z przewidywaniami, eksperymentalne usunięcie połowy gruczołów sutkowych i proporcjonalne zmniejszenie liczby karmionych osesków wiązało się ze zmniejszeniem ilości produkowanego przez matki mleka. Wynik ten sugerował, że gruczoły mleczne pracują w okresie laktacji z maksymalną wydolnością, w związku z czym, matki nie są w stanie wyprodukować więcej mleka, mimo wyższych wymagań nakładanych przez potomstwo.

Założenia obu hipotez nie zostały potwierdzone w badaniach Johnsona i Speakmana (2001), którzy zaobserwowali podwyższoną konsumpcję pokarmu i większą produkcję mleka u laktujących myszy laboratoryjnych szczepu MF1, poddanych ekspozycji do temperatury 8°C. Wynik ten sugerował, że w pewnych okolicznościach zwierzęta są w stanie zwiększać ilość pobieranego pokarmu oraz ilość pozyskiwanej z niego energii. Obserwacja ta doprowadziła do sformułowania alternatywnej do wspomnianych, hipotezy dyskutującej ograniczenia w maksymalnym SuSMR, tj. hipotezy o ograniczeniach w rozpraszaniu ciepła.

Hipoteza o ograniczeniach w rozpraszaniu ciepła (ang. *Heat Dissipation Limitation Hypothesis*; HDL) zakłada, że budżety energetyczne zwierząt są ograniczane przez zdolność do sprawnego rozpraszania ciepła, powstającego jako produkt uboczny procesów metabolicznych (Król i Speakman 2003a). Założenia hipotezy HDL są obecnie intensywnie testowane przy wykorzystaniu małych ssaków, głównie laktujących gryzoni i zajęczaków (przegląd w Speakman i Król 2011). Ponieważ przepływ ciepła między organizmem a jego otoczeniem jest funkcją zależną od gradientu temperatur, hipoteza HDL testowana jest głównie na dwa sposoby, oba opierają się na manipulacjach między temperaturą otoczenia a temperaturą ciała zwierzęcia.

Pierwsze podejście do testowania założeń hipotezy HDL opiera się na ekspozycji samic i ich potomstwa do niskiej lub wysokiej temperatury otoczenia. Poddanie myszy laboratoryjnych szczepu MF1 (Johnson i Speakman 2001) i chomików syryjskich (*Mesocricetus auratus*; Ohrnberger i in. 2018) działaniu temperatury 8°C spowodowało podwyższenie konsumpcji pokarmu, produkcję większej ilości mleka o wyższej zawartości energii oraz odstawianie przez matki miotów cięższych niż w przypadku samic przetrzymywanych w temperaturze kontrolnej. Chomiki stepowe (*Cricetulus barabensis*) i chomiczniki dżungarskie (*Phodopus sungorus*) wychowujące mioty w temperaturze 5°C, jadły więcej pokarmu niż w warunkach kontrolnych, jednak tempo wzrostu ich młodych w niskiej temperaturze pozostało bez zmian (Paul i in. 2010, Zhao 2011). Laktujące myszy laboratoryjne szczepu Swiss, przetrzymywane w temperaturze 5°C, również zwiększały konsumpcję pokarmu i energetyczność produkowanego mleka w porównaniu do matek znajdujących się w 21°C, przy czym tempo przyrostu miotów także nie było szybsze (Zhao i in. 2013b). Inaczej niż w badaniach z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych, laktujące samice zająca szaraka (*Lepus europaeus*) przyswajały więcej energii nie w temperaturze 5°C, ale w warunkach termoneutralnych (Valencak i in. 2010).

Testowanie założeń hipotezy HDL poprzez ekspozycję matek do temperatur otoczenia bliskich górnej granicy strefy termoneutralnej także nie przyniosło jednoznacznych wyników. W temperaturze 30°C laktujące samice nornika zwyczajnego (*Microtus arvalis*; Simons i in. 2011), chomika stepowego (*Cricetulus barabensis*; Huang i in. 2020), chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*; Ohrnberger i in. 2018), nornika Brandta (*Lasiopodomys brandtii*; Wu i in. 2009) oraz myszy laboratoryjnych szczepów

Swiss (Zhao i in. 2016) i MF1 (Król i Speakman 2003b) jadły mniej pokarmu i produkowały mleko o mniejszej zawartości energii w porównaniu do matek wychowujących młode w temperaturze pokojowej (21°C lub 22°C) oraz niskiej temperaturze otoczenia (5°C lub 8°C). U wymienionych gatunków, z wyjątkiem chomika syryjskiego oraz nornika Brandta, masa potomstwa wychowywanego w temperaturze 30°C była istotnie niższa niż młodych wychowywanych w temperaturze pokojowej (Wu i in. 2009, Ohrnberger i in. 2018). U laktujących samic myszy laboratoryjnych szczepu Swiss, poddanych działaniu ekstremalnie wysokiej temperatury otoczenia (32,5°C), zaobserwowano obniżone tempo przyrostu miotów w porównaniu do tych, które wychowywane były w temperaturze 21°C oraz zredukowaną wydolność reprodukcyjną dorosłego już potomstwa, wcześniej wychowywanego w ekstremalnie wysokiej temperaturze (Bao i in. 2020). Samice myszoskoczka mongolskiego (*Meriones unguiculatus*), opiekujące się potomstwem w temperaturze 30°C, redukowały energetyczność produkowanego mleka w porównaniu do matek znajdujących w temperaturze 21°C, przy czym ich konsumpcja pokarmu pozostawała na tym samym poziomie (Yang i in. 2013a). Co ciekawe, wykorzystanie sztucznego źródła wiatru, jako czynnika ułatwiającego rozpraszanie metabolicznego ciepła u laktujących samic myszy laboratoryjnej szczepu Swiss poddanych ekspozycji do 32,5°C, spowodowało wzrost ilości energii inwestowanej w opiekę nad potomstwem. Matki poddane tej eksperymentalnej manipulacji zwiększyły ilość konsumowanego pokarmu, produkowały mleko o większej zawartości energii, a ich mioty przyrastały szybciej w porównaniu do samic kontrolnych (Deng i in. 2020).

Testując wpływ temperatury otoczenia na maksymalne wydatki energetyczne samic podczas laktacji, przeprowadzono eksperymenty, w których starano się oddzielić skutki ekspozycji do określonej temperatury otoczenia u matek od ich potomstwa. Valencak i współautorzy (2013) wykorzystali w tym celu specjalnie zaprojektowane klatki, w których potomstwo myszy laboratoryjnych szczepu MF1 poddano działaniu temperatury 21°C, natomiast pokarm umieszczono w temperaturze 10°C. Obie części klatki połączono tunelem, który umożliwiał samicy swobodne poruszanie się między nimi. Wykazano, że dostęp do klatki z pokarmem, w której była niższa temperatura, umożliwił matkom efektywniejsze rozpraszanie ciepła, co wpłynęło na zwiększenie konsumpcji pokarmu i produkcję mleka o większej zawartości energii, jednak nie

przyspieszyło przyrostu miotów. W innym eksperymencie Zhao i współautorzy (2016) wykazali, że ekspozycja matek do temperatury 30°C, a ich potomstwa do temperatury 21°C, obciążyła budżety energetyczne samic znacznie bardziej niż w przypadku odwrotnego schematu. Matki te konsumowały mniej pokarmu, miały niższe dzienne wydatki energetyczne, produkowały mleko o niższej zawartości energii oraz wychowywały mioty o mniejszej masie w porównaniu do układu w którym potomstwo poddane było ekspozycji do 30°C a matki do 21°C. Wynik ten potwierdzał założenia hipotezy HDL, ale co ważniejsze pokazał, że czynniki limitujące maksymalne wydatki energetyczne podczas laktacji związane są z fizjologią matek, a nie z wymaganiami nakładanymi przez potomstwo.

Drugim sposobem manipulowania gradientem temperatury między ciałem matki a temperaturą otoczenia, stosowanym przy testowaniu założeń hipotezy HDL, jest golenie sierści laktujących samic. Futro zwierząt stanowi warstwę izolacyjną, której przewodność jest kluczowym czynnikiem wpływającym na rozpraszanie ciepła. Golenie sierści, w przeciwieństwie do ekspozycji do skrajnych temperatur otoczenia, umożliwia zwiększenie zdolności samic do rozpraszania ciepła, ale bez wywierania wpływu na ich potomstwo (Król i in. 2007, Zhao i Cao 2009, Paul i in. 2010, Sadowska i in. 2016, Ohrnberger i in. 2020). Badania pokazały, że pozbawione sierści samice myszy laboratoryjnych szczepu MF1 (Król i in. 2007), chomików syryjskich (Ohrnberger i in. 2020) oraz nornic rudych selekcionowanych w kierunku wysokiego tempa metabolizmu tlenowego (*Myodes glareolus*; Sadowska i in. 2016) zwiększały konsumpcję pokarmu i produkowały mleko o większej zawartości energii, co przekładało się na szybsze tempo przyrostu masy ich miotów w porównaniu z tempem wzrostu potomstwa matek niegolonych. Z drugiej strony, o ile usuwanie sierści u myszy laboratoryjnych szczepu Swiss (Zhao i Cao 2009, Zhao i in. 2010b) oraz chomiczników dzungarskich (Paul i in. 2010) powodowało wzrost konsumpcji pokarmu, to nie miało wpływu na ilość i energetyczność produkowanego mleka, jak również tempo przyrostu masy miotów. W przypadku norników zwyczajnych, golenie sierści powodowało szybszy przyrost masy miotu, ale nie towarzyszyła temu produkcja mleka o zwiększonej zawartości energii (Simons i in. 2011).

Jeśli założenia hipotezy HDL są słuszne, miarą ograniczeń w pozbywaniu się metabolicznego ciepła, zwłaszcza u laktujących samic eksponowanych do wysokich

temperatur otoczenia, powinien być wzrost ich temperatury ciała. Badania pokazały, że samice myszy szczepu Swiss laktujące w temperaturze 30°C lub 32,5°C miały wyższą temperaturę ciała w porównaniu do matek, laktujących w temperaturze 21°C (Wen i in. 2017, Deng i in. 2020). Co więcej, Wen i współautorzy (2017) wykazali istnienie dodatniej korelacji między masą miotu a temperaturą ciała matek przetrzymywanych w temperaturze 30°C. Z drugiej jednak strony, samice chomika syryjskiego laktujące w temperaturze 22°C miały wyższą temperaturę ciała w porównaniu do matek wychowujących potomstwo w temperaturze 30°C (Ohrnberger i in. 2018). Laktujące myszy szczepu Swiss eksponowane do 30°C, podczas gdy ich potomstwo znajdowało się w temperaturze pokojowej, miały niższą temperaturę ciała w szczycie laktacji, w porównaniu do temperatury ciała matek w odwrotnym schemacie eksperymentu (Zhao i in. 2016). Zastosowanie procedury golenia powinno znosić ograniczenia w pozbywaniu się metabolicznego ciepła, matki powinny łatwiej się go pozbywać i w konsekwencji obniżać temperaturę ciała. I tak np. usuwanie sierści u myszy laboratoryjnych laktujących w temperaturze 21°C skutkowało ich szybszym wychładzaniem się i obniżaniem temperatury ciała w porównaniu do samic niegolonych (Zhao i Cao w 2009).

Ponieważ eksponowanie laktujących samic do niskich lub wysokich temperatur otoczenia, jak również usuwanie matkom warstwy izolacyjnej nie daje, jak dotąd, jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, gdzie leżą ograniczenia ich maksymalnych wydatków energetycznych, w testowaniu słuszności założeń hipotezy HDL próbowano stosować też inne manipulacje doświadczalne. Jednym z pomysłów jest karmienie laktujących samic dietą o zróżnicowanej zawartości składników odżywczych. Zakładano, że z uwagi na mniejszą produkcję ciepła, towarzyszącą trawieniu kwasów tłuszczowych w porównaniu do trawienia węglowodanów, laktujące matki otrzymujące pokarm o wysokiej zawartości tłuszczu powinny być zdolne do konsumpcji większej ilości pokarmu. Ponadto, zawarte w pokarmie kwasy tłuszczowe mogą być wykorzystane do produkcji lepszego jakościowo mleka, ale bez zwiększonej produkcji ciepła towarzyszącej procesowi laktogenezy. Przypuszczenia te potwierdziły wyniki badań przeprowadzonych na myszach laboratoryjnych szczepów Swiss i MF1, u których wykazano istnienie dodatniej korelacji między zawartością tłuszczu w diecie a jakością mleka. Co ciekawe, w przypadku myszy laboratoryjnych ze szczepu Swiss, stosowanie

diety o bardzo dużej zawartości kwasów tłuszczowych (47,1% i powyżej) nie wiązało się z podwyższoną zawartością tłuszczu w mleku, głównie z uwagi na brak potencjalnych korzyści dla potomstwa (Kagya-Agyemang i in. 2018, Huang i in. 2020). Inna manipulacja polegała na zastosowaniu biegania w celu uzyskania przez matki nieograniczonego dostępu do pokarmu. W badaniach zaprojektowano trzy grupy eksperymentalne różniące się długością dystansu, jaki matki musiały pokonać. Wykazano, że samice myszy laboratoryjnej w okresie późnej laktacji unikają dodatkowego wysiłku, mogącego doprowadzić do hipotermii. Matki, które pokonywały najdłuższy dystans, by uzyskać dostęp do pokarmu, miały najniższą konsumpcję, czego skutkiem było wychowywanie przez nie miotów o niższej masie (Zhao i in. 2013a). W eksperymencie, w którym oceniano czas, jaki laktujące samice nornika zwyczajnego spędzały w gniazdach wraz z potomstwem wykazano, że matki przetrzymywane w temperaturze 30°C znacznie skracają czas przebywania w gniazdach w porównaniu do samic wychowujących młode w temperaturze pokojowej. Zachowanie to zmniejsza ryzyko hipotermii z uwagi na ograniczenie ilości ciepła pobieranego od potomstwa, z drugiej jednak strony negatywnie wpływa na intensywność opieki rodzicielskiej matek (Vinne i in. 2014). Testowanie czynników limitujących maksymalne tempo przetwarzania energii podczas laktacji opierało się też na manipulowaniu wielkością wychowywanych przez samice miotów. Duah i współautorzy (2013) wykazali, że u samic myszy laboratoryjnych, wychowujących mioty o zmanipulowanej wielkości (5 lub 16 młodych w miocie), konsumpcja pokarmu, masa miotu oraz masa poszczególnych osesków w miocie zależała od liczby młodych wychowywanych przez matkę, a nie od liczby młodych, jaka się urodziła. Inny eksperyment pokazał, że u samic myszy laboratoryjnych, wychowujących mioty o zredukowanej wielkości (1, 3, 5, 7 lub 9 młodych w miocie), istniała pozytywna korelacja między liczbą osesków w miocie a ilością konsumowanego pokarmu i energetycznością produkowanego mleka. Wyniki te pokazują, że wysiłek rodzicielski ograniczany jest przez zdolność matek do pobierania pokarmu i produkcji mleka, jak również przez wymagania nakładane przez potomstwo (Duah i in. 2013, Zhao i in. 2013b).

Założenia hipotezy HDL próbowano też weryfikować z wykorzystaniem dwóch modeli zwierzęcych uzyskanych na drodze sztucznych eksperymentów selekcyjnych. Eksperyment przeprowadzony z wykorzystaniem nornic rudych (*Myodes glareolus*)

selekcjonowanych w kierunku maksymalnego tempa metabolizmu tlenowego wymuszonego pływaniem (ang. *High Aerobic Exercise Metabolism*) oraz nieselekcjonowanych linii kontrolnych wykazał wzrost konsumpcji pokarmu i wyższe parametry opisujące wysiłek rodzicielski (tj. tempo przyrostu masy miotu, zawartość energii w mleku, ilość energii metabolizowanej przez matki oraz ich dzienne wydatki energetyczne) u samic pozbawionych sierści. Przyrost ten utrzymywał się jednak na takim samym poziomie w obrębie nornic selekcjonowanych (o wysokim metabolizmie wysiłkowym) i nieselekcjonowanych nornic kontrolnych (Sadowska i in. 2016). Wykorzystanie tego modelu zwierzęcego nie przyniosło jeszcze potwierdzenia słuszności założeń hipotezy HDL, czego przyczyną może być mała różnica w tempie metabolizmu podstawowego (ang. *Basal Metabolism Rate; BMR*) między nornicami z linii selekcjonowanych i kontrolnych (utrzymująca się na poziomie około 10%; Sadowska i in. 2015b). Eksperyment z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych selekcjonowanych w kierunku utrzymywania niskiej (linia ML) i wysokiej (linia MH) konsumpcji pokarmu pokazał większą zawartość energii w produkowanym mleku i szybsze tempo wzrostu potomstwa u laktujących samic z linii MH. Wynik ten może być jednak konsekwencją genetycznie uwarunkowanej wyższej przewodności cieplnej obserwowanej u myszy z linii MH, w porównaniu do matek reprezentujących linię z niską konsumpcją pokarmu i niższą przewodnością cieplną (Selman i in. 2001, Al Jothery i in. 2014).

Wydaje się, że prawdopodobną przyczyną dotychczasowych niejednoznaczności w poszukiwaniu czynników limitujących SuSMR może być rozpatrywanie otrzymanych wyników wyłącznie pod kątem wysiłku rodzicielskiego, bez uwzględniania wydatków energetycznych ponoszonych na inne funkcje fizjologiczne, w tym np. na funkcjonowanie układu odpornościowego. Istnienie kompromisów fizjologicznych (ang. *trade-offs*) między kosztami reprodukcji a budowaniem reakcji obronnej jest ważnym aspektem biologii ewolucyjnej i zostało już wielokrotnie udokumentowane (Klein i Nelson 1999, Lochmiller i Deerenberg 2000, French i in. 2007, Cai i in. 2009, Hegemann i in. 2013, Yang i in. 2013b, Carlton i in. 2014, Contreras-Garduno i in. 2014, Segner i in. 2017, Schoepf i in. 2017). Zgodnie z teorią historii życiowych (Stearns 2002) ilość energii, jaką organizm dysponuje, jest ograniczona. W związku z tym, zwierzęta w odpowiedzi na te ograniczenia, powinny dawać priorytet funkcji kluczowej do

przeżycia, kosztem redukcji ilości energii przeznaczonej na funkcje mniej istotne. Zarówno reprodukcja, jak i odpowiedź immunologiczna są funkcjami wymagającymi energii, powodują uwalnianie się dużych ilości metabolicznego ciepła, zatem idealnie wpisują się w założenia hipotezy HDL (Buttgereit i in. 2000, Demas i in. 1997, Leshchinsky i Klasing 2001, Martin i in. 2003 i 2007, Cutrera i in. 2010, Speakman i Król 2011, Książek i Konarzewski 2016).

Poza tym, w poszukiwaniu mechanizmów ograniczających maksymalne tempo przetwarzania energii, kluczowa może okazać się wiedza o długookresowym tempie metabolizmu oraz energetycznych kosztach utrzymania poszczególnych funkcji fizjologicznych. Wydatki energetyczne ponoszone na utrzymanie zasadniczych funkcji życiowych określane są mianem podstawowego tempa metabolizmu (BMR; Schmidt-Nielsen 1997). BMR stanowi powszechnie wykorzystywaną miarę ilości energii przeznaczanej na utrzymanie zwierzęcia, koreluje też z wieloma parametrami determinującymi procesy życiowe (Ronning i in. 2007, McKechnie i in. 2008, Sabat i in. 2009 oraz 2010, Duarte i in. 2010, Li i in. 2010, Konarzewski i Książek 2013, White i Kearney 2013, Luna i in. 2017, Swanson i in. 2017, Reade i in. 2019, Genoud 2022, Tang i in. 2022). Jeśli założenia hipotezy HDL są słuszne, obciążenie samic jednoczesną opieką na potomstwem oraz budowaniem reakcji obronnej powinno doprowadzić do ujawniania się wspomnianych wyżej kompromisów, bezpośrednio powiązanych z indywidualnymi kosztami utrzymania zwierzęcia.

W związku z powyższym, proponuję nowe podejście do testowania hipotezy o ograniczeniach w rozpraszaniu ciepła - chcę powrócić do idei kompromisów (*trade-offs*) i testować ich ujawnianie się w kontekście hipotezy HDL. Nie udało się, jak dotąd, jednoznacznie potwierdzić założeń hipotezy HDL o ograniczającym wpływie trudności w oddawaniu ciepła na wysiłek rodzicielski, ponieważ w testowanych układach eksperymentalnych matki obniżały metaboliczne koszty innych aktywności i dawały priorytet tylko reprodukcji. W niniejszej pracy skupiam się założeniu, że jeśli budżet energetyczny laktujących samic jest ograniczony przez trudności w oddawaniu ciepła, ujawnią się kompromisy między inwestowaniem w opiekę rodzicielską a funkcjonowaniem układu obronnego. Test tej hipotezy możliwy jest tylko wtedy, jeśli zastosowana manipulacja spowoduje nie tylko podnoszenie wydatków energetycznych samic do momentu pojawienia się fizycznych ograniczeń w oddawaniu ciepła, ale

przede wszystkim wymusi kompromis między inwestowaniem w reprodukcję lub odporność. Odpowiedź immunologiczna doskonale wpisuje się w powyższy scenariusz, ponieważ jest funkcją wymagającą energii (np. Martin i in. 2003, Cutrera i in. 2010) i generuje ciepło w postaci gorączki (Luheshi 1998, Leshchinsky i Klasing 2001), co przybliży karmiące samice do górnej granicy ich zdolności do utraty ciepła (Książek i Konarzewski 2016).

Odpowiednim modelem do testowania założeń hipotezy HDL wydają się być osobniki o genetycznie uwarunkowanej różnicy w ilości produkowanej i wydatkowanej energii, ale nie różniące się przewodnością cieplną. Jako model badawczy wybrałam unikatowe linie myszy laboratoryjnych szczepu Swiss-Webster, sztucznie selekcjonowane w kierunku utrzymania niskiego (L-BMR) lub wysokiego (H-BMR) poziomu metabolizmu podstawowego (według protokołu opisanego w Książek i in. 2004). Eksperyment selekcyjny prowadzony na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku doprowadził do utrzymywania się międzyliniowej różnicy w tempie metabolizmu podstawowego na poziomie ponad 50 %. Ponadto, myszy z obu linii selekcyjnych różnią się kilkoma innymi cechami skorelowanymi z BMR, istotnymi w kontekście testowania założeń hipotezy HDL. Myszy z wysokim tempem metabolizmu podstawowego (linia H-BMR), w porównaniu do osobników z linii L-BMR, charakteryzują się wyższą konsumpcją pokarmu (Książek i in. 2004), mają większą masę narządów aktywnych metabolicznie (wątroby, nerek, serca oraz jelita cienkiego (Książek i in. 2004, Konarzewski i in. 2005, Konarzewski i Książek 2013), utrzymują wyższą temperaturę ciała w warunkach termoneutralnych oraz w temperaturze 30°C (Gębczyński 2005, Książek i Konarzewski 2016). W porównaniu do laktujących samic z linii L-BMR, matki z linii H-BMR inwestują więcej energii w opiekę nad potomstwem, czego wyrazem jest produkcja większej ilości mleka bogatszego w laktozę oraz szybsze tempo wzrostu młodych (Sadowska i in. 2013 oraz 2015a). Osobniki z obu linii selekcyjnych różnią się także poziomem odpowiedzi immunologicznej typu swoistego. Myszy z wysokim BMR produkują więcej specyficznych przeciwciał klasy IgM w odpowiedzi na antygen KLH (ang. *Keyhole Limpet Hemocyanin*), utrzymują większą liczbę leukocytów we krwi obwodowej, mają większą masę narządów limfatycznych (śledziony i węzłów chłonnych) w porównaniu do osobników z linii L-BMR (Książek i in. 2003, Książek i Konarzewski 2012 oraz 2016). Co istotne, zastosowanie procedury

sztucznej selekcji nie doprowadziło do ujawnienia się istotnych międzyliniowych różnic w masie ciała, jak również w przewodności cieplnej zwierząt (Gębczyński 2005, Konarzewski i Książek 2013).

Opisany model posłużył już do testowania założeń hipotezy HDL. Eksperyment (Sadowska i in. 2019) opierał się na usuwaniu sierści laktującym samicom z obu linii selekcyjnych, wychowującym zmanipulowane doświadczalnie mioty. Każda z matek wychowywała w temperaturze 23°C mioty składające się z 8 młodych (4 oseski z linii L-BMR i 4 oseski z linii H-BMR). Wyniki nie potwierdzają wpływu golenia na konsumpcję pokarmu. Okazało się natomiast, że mioty wychowywane przez golone matki z linii L-BMR przyrastają wolniej, niż mioty karmione przez matki niegolone z obu linii selekcyjnych oraz golone matki z linii H-BMR. Zebrane dane pokazują, że ekspozycja laktujących samic do temperatury 23°C nie ogranicza zdolności niegolonych matek z obu linii selekcyjnych do rozpraszania ciepła. W obrębie obu linii selekcyjnych, samice pozbawione sierści nie zwiększają ilości przyswajanej energii oraz nie wychowują większego potomstwa w porównaniu do matek niegolonych. Zebrane dane nie wpisują się w założenia hipotezy HDL, ale dają przesłanki do wykorzystania tego modelu w testowaniu hipotezy w innym układzie eksperymentalnym. Zastosowanie temperatury 23°C okazało się niewystarczające do obciążenia budżetów energetycznych matek w takim stopniu, by efekt golenia okazał się istotny (Sadowska i in. 2019). Ze względu na międzyliniowe różnice w opisanych powyżej cechach związanych z przyswajaniem i wydatkowaniem energii, obiecujące wydaje się poddanie myszy laboratoryjnych o niskim lub wysokim BMR ekspozycji do wyższej temperatury otoczenia, przy której rozpraszanie ciepła podczas laktacji będzie maksymalnie utrudnione.

Celem mojej rozprawy doktorskiej jest testowanie założeń hipotezy HDL w kontekście ujawniania się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych o różnym tempie metabolizmu podstawowego. Jeśli maksymalne tempo przetwarzania energii ograniczane jest przez zdolność do rozpraszania ciepła, jednoczesne obciążenie samic kosztami związanymi z opieką nad potomstwem oraz budowaniem reakcji odpornościowej, powinno przybliżyć je do ich górnej granicy zdolności do rozpraszania ciepła, w konsekwencji doprowadzić do ujawnienia się kompromisów między tymi

funkcjami. Ponadto, odpowiedź na taką manipulację powinna być zależna od genetycznie uwarunkowanego tempa przetwarzania energii (tj. przynależności do linii selekcyjnej). W rozprawie doktorskiej testuję trzy hipotezy szczegółowe:

Hipoteza 1: samice odpowiedzą na ograniczenia w rozpraszaniu ciepła dając pierwszeństwo budowaniu reakcji obronnej kosztem redukowania wysiłku rodzicielskiego. Redukcja będzie bardziej widoczna u samic z linii o wysokim BMR, ponieważ mają one wyższe tempo metabolizmu i produkują więcej ciepła, mają też wyższą temperaturę ciała i inwestują więcej energii w opiekę nad młodymi. Nie spodziewam się międzyliniowych różnic w odpowiedzi immunologicznej. Wynik ten jest prawdopodobny zwłaszcza w kontekście teorii historii życiowych, która zakłada, że zwierzęta ograniczają bieżącą reprodukcję, jeśli zagraża ona sukcesowi rozrodczemu w przyszłości.

Hipoteza 2: na trudności z rozpraszaniem ciepła samice zareagują poprzez supresję odpowiedzi immunologicznej zależną od przynależności do linii selekcyjnej. Opieka rodzicielska pozostanie na tym samym poziomie. Taki scenariusz jest prawdopodobny wtedy, gdy samice inwestują w bieżącą reprodukcję kosztem przyszłego rozrodu.

Hipoteza 3: reakcja na łączny efekt laktacji i stresu obronnego będzie po części odzwierciedlać Hipotezę 1 i 2. Odpowiedź będzie zależała od przynależności do linii selekcyjnej. Matki z linii o wysokim BMR znacznie bardziej obniżą swój wysiłek reprodukcyjny i odpowiedź immunologiczną niż ich odpowiedniczki z linii o niskim tempie metabolizmu.

By zweryfikować postawione hipotezy przeprowadziłam trzy komplementarne eksperymenty, różniące się wyłącznie zastosowanymi w nich manipulacjami. W Eksperymentcie 1 (Rozdział 2) zastosowałam procedurę golenia matek w 6 i 10 dniu laktacji. Zmanipulowałam w ten sposób wpływ gradientu temperatury między ciałami matek i otoczeniem, podnosząc ich zdolność do oddawania ciepła. Wyniki tej manipulacji mają służyć jako porównanie z innymi pracami, gdzie także stosowano golenie sierści (np. Król i in. 2007, Sadowska i in. 2016, Sadowska i in. 2019) i stanowią tło dla pozostałych dwóch eksperymentów. W Eksperymentcie 2 (Rozdział 3) obciążałam budżet energetyczny matek produkcją dodatkowego ciepła metabolicznego generowanego przez rozwój reakcji obronnej. W 9 dniu laktacji podałam samicom antygen KLH (ang. *Keyhole Limpet Haemocyanin*; białko izolowane od ślimaka

Megathura crenulata). Łączny wpływ golenia i immunizacji na wydatki energetyczne samic testowałam w Eksperymentcie 3 (Rozdział 4). Każdy eksperyment przeprowadziłam w 2 temperaturach (30°C oraz temperatura kontrolna 23°C), które pozorowały odpowiednio silny oraz słaby stres termiczny. Spodziewałam się, że wydatki energetyczne będą szczególnie ograniczone przez indywidualne zdolności do oddawania ciepła w 30°C, ponieważ przepływ ciepła między zwierzęciem a jego środowiskiem jest przede wszystkim funkcją gradientu temperatury (Speakman i Król 2010).

Podczas 14-dniowego okresu laktacji kontrolowałam masę i temperaturę ciała samic, ich konsumpcję oraz strawność pokarmu, jak również tempo przyrostu masy miotów. W szczycie laktacji szacowałam ilość energii asymilowanej przez matki (ang. *Metabolizable Energy Intake*; MEI), ilość energii w mleku (ang. *Milk Energy Output*; MEO) oraz dzienne wydatki energetyczne matek (ang. *Daily Energy Expenditure*; DEE). Każdy eksperyment kończył się w 14 dniu życia młodych, kiedy zaczynają one samodzielnie zgryzać stały pokarm i przestają korzystać z mleka matki. Zebrane dane wykorzystałam do oceny okoliczności ujawniania się kompromisów fizjologicznych między wysiłkiem reprodukcyjnym a rozwojem reakcji obronnej, których podłożem powinny być międzyliniowe różnice w zdolności do rozpraszania metabolicznego ciepła.

2. Wpływ golenia na wysiłek reprodukcyjny samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)

Jak zaznaczyłam we Wstępie, w rozprawie proponuję testowanie hipotezy HDL w oparciu o ideę kompromisów między kosztami wysiłku reprodukcyjnego a kosztami rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Jeśli budżet energetyczny laktujących samic jest ograniczany przez trudności w oddawaniu ciepła, ujawniać się powinny kompromisy (*trade-offs*) między inwestowaniem w opiekę rodzicielską a funkcjonowaniem układu obronnego. Testowanie okoliczności ujawniania się tych kompromisów poprzedziłam Eksperymentem 1, w którym na kilka dni przed szczytem laktacji zastosowałam procedurę usunięcia laktującym samicom sierści, bez stymulowania układu odpornościowego do rozwoju odpowiedzi immunologicznej. W odróżnieniu od badań testujących hipotezę HDL z wykorzystaniem tych samych linii selekcyjnych myszy o niskim lub wysokim BMR (Sadowska i in. 2019), w Eksperymentcie 1 poddałam matki ekspozycji do temperatury 30°C. Przywołane powyżej badania pokazały, że usuwanie sierści nie podnosiło wysiłku reprodukcyjnego matek z obu linii selekcyjnych, przy czym laktujące samice przetrzymywane były tylko w temperaturze 23°C (Sadowska i in. 2019).

Opisany w tym rozdziale Eksperyment 1 miał zatem na celu odpowiedzieć na pytanie, jak golenie sierści wpłynie na wysiłek rodzicielski matek o różnym BMR, których indywidualne predyspozycje do rozpraszania metabolicznego ciepła zostały obciążone ekspozycją do temperatury 30°C. Uzyskane w tym eksperymencie wyniki posłużyły mi jako tło do dwóch pozostałych eksperymentów (Eksperyment 2 i 3 opisane w Rozdziale 3 i 4). Ponadto, z uwagi na utrzymanie schematu badań analogicznego do innych prac testujących hipotezę HDL, uzyskane wyniki umożliwiają mi dyskusję z wynikami prac, w których także stosowano procedurę golenia sierści matek jako narzędzie do manipulowania gradientem temperatury między ciałem matek a temperaturą otoczenia (np. Król i in. 2007, Zhao i Cao 2009, Paul i in. 2010, Simons i in. 2011, Sadowska i in. 2016, Ohrnberger i in. 2020).

Spodziewałam się, że ekspozycja matek do temperatury 30°C utrudni im rozpraszanie metabolicznego ciepła, co przełoży się na redukcję wysiłku rodzicielskiego w porównaniu do samic umieszczonych w temperaturze 23°C. Co więcej, ograniczający

efekt stresu termicznego powinien być bardziej dotkliwy dla matek z linii o wysokim BMR, gdyż mają one wyższe wydatki energetyczne, utrzymują wyższą temperaturę ciała oraz więcej inwestują w opiekę nad potomstwem, w porównaniu do matek z linii L-BMR. Zakładałam ponadto, że usuwanie sierści laktujących samic podniesie ich zdolności do rozpraszania ciepła w temperaturze 30°C, w związku z czym mioty matek pozbawionych sierści powinny przyrastać szybciej. Spodziewałam się, że efekt golenia będzie bardziej zauważalny u matek z linii H-BMR, z uwagi na ich większe obciążenia związane z wydatkami energetycznymi i produkcją ciepła w porównaniu do myszy z linii L-BMR.

2.1. Materiały i metody

2.1.1. Obiekt badań

W doświadczeniu wykorzystałam samice myszy laboratoryjnych szczepu Swiss Webster (*Mus musculus*), pochodzące z pokolenia F53 sztucznego eksperymentu selekcyjnego, prowadzonego w kierunku rozbieżnego tempa metabolizmu podstawowego. Selekcja ta jest prowadzona w Katedrze Ekologii Ewolucyjnej i Fizjologicznej na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Szczegółowy opis procedur stosowanych podczas prowadzenia eksperymentu selekcyjnego znajduje się w pracy Książek i współautorów (2004). W skrócie, tempo metabolizmu podstawowego myszy w wieku od 12 do 16 tygodni mierzyłam z wykorzystaniem respirometru przepływowego systemu otwartego (S-3A/II Applied Electrochemistry, Pittsburgh, PA, USA). Pomiar odbywał się w komorze metabolicznej zanurzonej w łaźni wodnej o temperaturze wody 32°C (w granicach strefy termoneutralnej dla tego gatunku; Lacy i Lynch 1979). Przed rozpoczęciem pomiaru zwierzęta głodzone były przez około 3 godziny, następnie poddane 1-godzinnej aklimacji w komorach metabolicznych zanurzonych w łaźni wodnej. Wartość BMR oznaczana była jako najniższy poziom konsumpcji tlenu, niezmienny w zakresie większym niż 0,01% w czasie 4 minut (Książek i in. 2004, Gębczyński i Konarzewski 2011, Sadowska i in. 2019). Po wykonaniu pomiaru, każde zwierzę ważone było z dokładnością do 0,1 g. Tempo metabolizmu podstawowego myszy analizowane było z wykorzystaniem specjalistycznego programu Sable System DATACAN V. Osobniki z najwyższymi lub najniższymi wartościami BMR zostały zakwalifikowane odpowiednio do linii H-BMR (wysoki BMR) lub do linii L-BMR (niski BMR). W Eksperymentcie 1

kojarzyłam z samcami łącznie 120 samic (po 60 samic z każdej linii selekcyjnej), wszystkie samice były w wieku około 18 tygodni. Po porodzie matki wychowywały swoje naturalne mioty. Podczas pomiarów BMR, w okresie ciąży i w czasie eksperymentu myszy przebywały w klimatyzowanych pomieszczeniach o fotoperiodzie 12h/12h (12 godzin dzień/12 godzin noc). Przy wykonywaniu poszczególnych procedur samice miały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Zwierzęta karmione były pełnowartościowym granulatem Labofeed produkowanym w Wytwórni Pasz A. Morawski (Kcynia).

2.1.2. Opis eksperymentu

Po zakończeniu pomiarów tempa metabolizmu podstawowego i potwierdzeniu przynależności samic do linii o niskim bądź wysokim BMR, były one kojarzone w obrębie linii selekcyjnej z losowo wybranymi samcami. U losowo wybranych samic moment kojarzenia był dodatkowo poprzedzony dootrzewnową implantacją transponderów do pomiaru temperatury ciała. Po około 2 tygodniach od kojarzenia, samce zabierano od samic i dalej pozostawały one w klatkach same. W tym momencie klatki zostały wzbogacone w długie ściłki miękkich wiórów i fragmenty ręcznika papierowego, które posłużyły samicom jako materiał gniazdowy. Eksperyment 1 rozpoczął się w dniu porodu, jego schemat znajduje się na Rycinie 1. W tym dniu, połowę matek z obu linii selekcyjnych wraz z ich miotami (30 matek z linii o niskim i tyle samo matek z linii o wysokim BMR) przenosiłam z temperatury 23°C do komory, w której utrzymywano temperaturę 30°C. Pozostałe samice (także po 30 matek z linii o niskim lub wysokim BMR) po porodzie przetrzymywane były w temperaturze 23°C. Począwszy od 2 dnia po porodzie, w odstępach 2-dniowych, prowadziłam kontrolę masy ciała matek, ważyłam masę całego miotu, monitorowałam liczbę młodych w miocie, kontrolowałam konsumpcję pokarmu, rejestrowana była też temperatura ciała matek. W 6 i 10 dniu po porodzie połowę laktujących samic z obu linii selekcyjnych, przetrzymywanych w obu temperaturach (tj. po 15 matek z linii L-BMR i H-BMR znajdujących się w 23°C oraz po 15 matek z linii L-BMR i H-BMR z 30°C) poddałam procedurze golenia sierści. W szczytowym punkcie laktacji (w moim modelu badawczym jest to okres między 12 a 14 dniem laktacji) oceniłam ilość asymilowanej przez matki energii (ang. *Metabolisable Energy Intake*; MEI), dzienne wydatki

energetyczne samic (ang. *Daily Energy Expenditure*; DEE) oraz ilość energii zawartej w mleku (ang. *Milk Energy Output*; MEO). Jako miarę wysiłku rodzicielskiego w Eksperymentach 1 (ale także w Eksperymentach 2 i 3 opisanych w następnych Rozdziałach) przyjął tempo przyrostu masy miotu podczas 14-dniowego okresu laktacji. Ostatecznie na cele Eksperymentu 1 stworzyłam 8 grup eksperymentalnych w układzie $2 \times 2 \times 2$ (tzn. linia L-BMR i H-BMR $\times$ temperatura 23°C i 30°C $\times$ golenie bądź brak golenia). Eksperyment 1 zakończył się 14 dnia po porodzie, kiedy młode zaczynają zgryzać stały pokarm i nie są zależne wyłącznie od mleka matki (Sadowska i in. 2013). W tym dniu samice były uśmiercone w celu pozyskania tkanek potrzebnych do dalszych analiz. Wszystkie procedury przeprowadzone na potrzeby Eksperymentu 1, jak również doświadczeń opisanych w następnych rozdziałach, otrzymały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie (uchwała nr 47/2017 z dn. 15.07.2017 roku).

2.1.3. Pomiar konsumpcji pokarmu, strawności oraz ilości asymilowanej energii

Konsumpcję i strawność pokarmu oceniałam co dwa dni przez cały okres laktacji, począwszy od 2 dnia po porodzie. Każda matka otrzymywała odważoną ilość pokarmu (± 50 g). Po upływie 2 dni, zbierałam niedojadki pokarmu i odchody znajdujące się w klatkach, następnie matki otrzymywały kolejną porcję odważonego pokarmu. Zebrane niedojadki pokarmu i odchody suszyłam 12 godz. w temperaturze 70°C (Binder, typ 9010-0231), następnie ważyłam je z dokładnością do 0,01 g. Opisane zabiegi wykonywane były zawsze o stałej porze dnia (między 10.00 a 12.00), aż do 14 dnia po porodzie. Konsumpcję pokarmu obliczałam dla każdej matki indywidualnie jako różnicę między ilością podanego i zjedzonego pokarmu, pomniejszoną o ilość niedojadków pokarmu (Konarzewski i Diamond 1994, Książek i in. 2003). Strawność pokarmu szacowałam jako różnicę między ilością zjedzonego pokarmu i ilością odchodów, dzieloną przez ilość zjedzonego pokarmu (Drożdż 1968, Książek i in. 2003).

Wartość energetyczną próbek pokarmu ($n = 4$) oraz wartość energetyczną odchodów matek oznaczyłam z wykorzystaniem bomby kalorymetrycznej (IKA Werke 7000 Calorimeter, Germany). Oznaczenie ilości energii brutto pobieranej z pokarmu (ang. *Gross Energy Intake*; GEI), ilości energii w odchodach matek (ang. *Gross Energy of faeces*; GE_{faeces}) oraz dziennego spożycia energii (ang. *Daily Energy Intake*; DEI)

posłużyło mi do oszacowania ilości energii przyswajanej przez matki z pokarmu (ang. *Metabolisable Energy Intake*; MEI). Ta ostatnia miara niezbędna była do oceny zawartości energii w mleku matek (szczegóły poniżej). Wymienione parametry szacowałam dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji (szczyt laktacji w opisanym modelu badawczym; Sadowska i in. 2013). Wartości wyszczególnionych powyżej miar obliczyłam z wykorzystaniem poniższych wzorów (Dróżdż 1975, Król i Speakman 2003b, Zhao i in. 2016, Wen i in. 2017, Zhao i in. 2020 ab):

1. $GEI \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)} = \text{konsumpcja pokarmu (g dzień}^{-1}\text{)} \times \text{zawartość suchej masy w pokarmie (\%)} \times \text{wartość energetyczna pokarmu (kJ g}^{-1}\text{)}$
2. $GE_{feaces} \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)} = \text{sucha masa odchodów (g dzień}^{-1}\text{)} \times \text{wartość energetyczna odchodów (kJ g}^{-1}\text{)}$
3. $DEI \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)} = GEI \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)} - GE_{feaces} \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)}$
4. $MEI \text{ (kJ dzień}^{-1}\text{)} = DEI \times (100\% - 97\%)$.

2.1.4. Pomiar dziennych wydatków energetycznych i ilości energii w mleku

Dzienne wydatki energetyczne (ang. *Daily Energy Expenditure*; DEE) oceniłam dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Do tego celu wykorzystałam metodę podwójnie znakowanej wody (ang. *Double Labelled Water*; DLW). W 12 dniu po porodzie samice zważyłam z dokładnością do 0,01 g, następnie podałam im dootrzewnowo dawkę 'ciężkiej wody', zawierającą izotopy tlenu ^{18}O i wodoru ^2H . Dawkę oceniłam ważąc strzykawkę z dokładnością do 0,0001 g zarówno przed, jak i po iniekcji. Po podaniu ciężkiej wody samice zostały umieszczone w swoich klatkach, a po upływie godziny pobrałam od nich pierwszą próbę krwi w ilości 50 μl (ang. *initial sample*), by ocenić wstępną zawartość izotopów we krwi. Końcowe próby (ang. *final samples*) pobrałam po upływie 48 godzin od pobrania prób początkowych. Zarówno początkowe, jak i końcowe próby krwi pobierane były z żyły ogonowej samic. Krew zbierałam do szklanych kapilar, których końce natychmiast zamykałam termicznie. Próby krwi pobrałam także od samic, które stanowiły grupę kontrolną i nie podawałam im ciężkiej wody. Do czasu wykonania analiz DEE, próby zabezpieczyłam i przetrzymywałam w temperaturze 23°C (Speakman 1997, Król i Speakman 2003b, Zhao i in. 2020b). Dawkę 'ciężkiej wody' podałam losowo wybranym matkom ($n = 64$), reprezentującym

wszystkie grupy eksperymentalne. Były to te same matki, dla których oszacowałam wartość GEI, GE_{feces}, DEI oraz MEI (szczegóły powyżej).

Ocenę dziennych wydatków energetycznych przeprowadziło specjalistyczne laboratorium na Uniwersytecie w Aberdeen, którego pracownicy przygotowali i dostarczyli ciężką wodę, i z którym współpracowałam przy wykonaniu tej części analiz. W uproszczeniu, kapilary zawierające krew były poddane destylacji próżniowej, a otrzymany destylat posłużył do produkcji CO₂ i H₂ (Speakman i Król 2005b). Stosunek izotopów ¹⁸O do ¹⁶O oraz ²H do ¹H oceniano za pomocą spektrometrii mas izotopów stabilnych (ang. *Gas Source Isotope Ratio Mass Spectrometry*, ISOCHROM μ GAS system and IsoPrime IRMS, Micromass, Manchester, UK). Stężenie izotopów przeliczane było na wartości DEE z wykorzystaniem modelu rekomendowanego dla zwierząt o określonej masie ciała (Speakman 1997). Oszacowane wartości DEE posłużyły mi następnie do oceny ilości energii zawartej w mleku (ang. *Milk Energy Output*; MEO) produkowanym przez matki w szczycie laktacji. Wartość tę obliczyłam z wykorzystaniem następującego równania (Król i Speakman 2003b, Zhao i in. 2016 i 2020ab):

$$\text{MEO (kJ dzień}^{-1}\text{)} = \text{MEI (kJ dzień}^{-1}\text{)} - \text{DEE (kJ dzień}^{-1}\text{)}.$$

2.1.5. Pomiar masy i temperatury ciała matek, masy miotu i liczby młodych w miocie

Zabiegom związanym z pomiarem konsumpcji pokarmu matek towarzyszyła też kontrola ich masy ciała. Masę ciała matek, podobnie jak masę miotów, oceniałam z dokładnością do 0,01 g. Dane te wykorzystałam do oceny tempa przyrostu masy miotów (szacowanego jako różnica w masie miotu między dwoma kolejnymi dniami laktacji). Podczas opisanych zabiegów monitorowałam też liczbę młodych w miocie.

Pomiar temperatury ciała matek rejestrowany był z dokładnością do 0,01°C co 10 minut przez cały okres laktacji. Do tego celu wykorzystałam transmitters (typu Star Oddi), które przed kojarzeniem w pary zostały dootrzewnowo zaimplantowane 40 losowo wybranym samicom (20 samicom z linii L-BMR i 20 samicom z linii H-BMR). Przed implantacją transmittersów, samice znieczulane były ksylazyną (w dawce 0,001 mg ksylazyny na każdy gram masy ciała) oraz ketaminą (w dawce 0,08 mg ketaminy na każdy gram masy ciała). Przez kilka dni po zabiegu samice przyjmowały środek przeciwbólowy rozpuszczony w wodzie do picia.

2.1.6. Procedura golenia sierści

W 6 dniu po porodzie przeprowadziłam procedurę golenia sierści. Zabieg ten powtórzyłam w 10 dniu po porodzie, co miało zapobiegać procesowi odrastania sierści. Przed zabiegiem usuwania sierści laktujące samice nie były poddawane znieczuleniu. Zrezygnowałam z anestezji, by w mleku matek nie znajdowały się środki usypiające, jak również produkty ich rozkładu. Do golenia sierści wykorzystałam elektryczną maszynkę do strzyżenia typu Remington. Podczas golenia usuwałam matkom około 75% sierści, zgodnie z opisem umieszczonym w pracy Król i współautorów (2007).

2.1.7. Morfometria

Po upływie 14 dni od porodu, każda samica została uśmiercona poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Pobrane narządy wewnętrzne (nerki, serce, wątrobę, jelito cienkie oraz brunatną tkankę tłuszczową) ważyłam z dokładnością 0,0001 g, następnie mroziłam w ciekłym azocie i zabezpieczyłam w temperaturze -80°C.

2.1.8. Analiza statystyczna

Masę ciała samic mierzoną przed rozpoczęciem Eksperymentu 1 (tj. przed kojarzeniem w pary) porównałam z wykorzystaniem 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA z przynależnością do linii selekcyjnej (L-BMR lub H-BMR) jako zmienną zależną.

Różnice w masie ciała oraz temperaturze ciała matek oceniłam za pomocą 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami (ang. *repeated measures* ANOVA/ANCOVA), gdzie zmienną zależną była masa ciała lub temperatura ciała (mierzona w 2, 6, 8, 10, 12 i 14 dniu po porodzie), a zmiennymi niezależnymi były przynależność do linii selekcyjnej (L-BMR lub H-BMR), temperatura otoczenia (23°C lub 30°C) oraz manipulacja gradientem temperatury (golenie sierści lub brak golenia). W przypadku analizy różnic w temperaturze ciała matek w okresie 14-dniowej laktacji zmienną ciągłą (kowariantem) była masa miotu w kolejnych dniach po porodzie.

Do oceny różnic w konsumpcji pokarmu, strawności pokarmu oraz w tempie przyrostu masy miotu (zmiennie zależne) także zastosowałam 3-czynnikową analizę wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, z przynależnością

do linii selekcyjnej, temperaturą otoczenia oraz manipulacją gradientem temperatury jako zmiennymi niezależnymi. Przy analizie różnic w konsumpcji pokarmu w okresie laktacji, jak również przy ocenie tempa przyrostu masy miotów zastosowałam zmienną ciągłą, którą była wielkość miotów (tj. liczba młodych w miocie) obserwowana w kolejnych dniach po porodzie. Zastosowanie analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami umożliwiło mi uwzględnienie w moich porównaniach dodatkowego czynnika - wpływu czasu na zmiany masy i temperatury ciała matek, konsumpcji pokarmu i jego strawności oraz na tempo przyrostu masy miotu.

Różnice w GEI, GE_{feaces} DEI, MEI, DEE oraz MEO (tj. miarach charakteryzujących ilość energii pobieranej i asymilowanej z pokarmu, dziennych wydatkach energetycznych, w tym tych inwestowanych w opiekę rodzicielską) analizowałam za pomocą 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA z przynależnością do linii selekcyjnej, temperaturą otoczenia i manipulacją gradientem temperatury jako zmiennymi niezależnymi oraz przyrostem masy miotu (między 12 a 14 dniem laktacji) jako zmienną ciągłą.

Do zbadania różnic w masie narządów aktywnych metabolicznie (jelita cienkiego, wątroby, nerek, serca i brunatnej tkanki tłuszczowej) zastosowałam 3-czynnikową analizę wariancji ANCOVA, w której zmiennymi niezależnymi także były przynależność do linii selekcyjnej, temperatura otoczenia i manipulacja gradientem temperatury. Masa ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszona o masę treści jelitowej i masę analizowanego narządu stanowiła w tej analizie zmienną ciągłą.

Jeśli zachodziła taka potrzeba, analizę różnic w wyszczególnionych powyżej cechach przeprowadziłam też oddzielnie w obrębie temperatury 23°C i 30°C. Zastosowałam w tym celu 2-czynnikową analizę wariancji ANOVA/ANCOVA lub analizę ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, gdzie przynależność do linii selekcyjnej i manipulacja gradientem temperatury stanowiły zmienne niezależne, a zmienną ciągłą były zmienne wskazane powyżej w odniesieniu do poszczególnych porównań.

Różnice w masie ciała samic przed reprodukcją, jak również zmiany masy ciała laktujących matek obserwowane po porodzie wyrażone są jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Zmiany w temperaturze ciała matek,

konsumpcji pokarmu, strawności pokarmu, przyroście masy miotu, zmiany w GEI, GE_{feces} , DEI, MEI, DEE, MEO oraz różnice w masie narządów wewnętrznych wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy ANOVA/ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Wyniki wszystkich analiz ANOVA/ANCOVA testowałam na poziomie istotności statystycznej $P = 0,05$. Analizy statystyczne wykonałam przy pomocy programu STATISTICA wersja 13.3.

2.2. Rezultaty

W analizach statystycznych uwzględniłam łącznie 88 samic wraz z ich miotami. Są to wszystkie matki, które wychowywały młode do 14 dnia laktacji i dla których zebrałam kompletne pomiary:

linia H-BMR, temperatura 23°C, matki golone: $n = 12$

linia H-BMR, temperatura 23°C, matki niegolone: $n = 12$

linia H-BMR, temperatura 30°C, matki golone: $n = 12$

linia H-BMR, temperatura 30°C, matki niegolone: $n = 9$

linia L-BMR, temperatura 23°C, matki golone: $n = 10$

linia L-BMR, temperatura 23°C, matki niegolone: $n = 9$

linia L-BMR, temperatura 30°C, matki golone: $n = 13$

linia L-BMR, temperatura 30°C, matki niegolone: $n = 11$.

2.2.1. Różnice w masie ciała matek

Przed kojarzeniem w pary samice z przeciwnych linii selekcyjnych nie różniły się masą ciała ($F_{1,86} = 1,88$; $P = 0,2$). Średnia masa ciała samic z linii H-BMR wynosiła 29,09 g ($\pm 0,4$), natomiast samic z linii L-BMR 29,97 g ($\pm 0,4$).

Aby ocenić różnice w masie ciała samic podczas laktacji wykorzystałam 3-czynnikową analizę ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Począwszy od 2 dnia po porodzie, masa ciała matek zmieniała się w ciągu kolejnych dni laktacji ($P < 0,0001$; Tabela 1). Spośród trzech zmiennych niezależnych, tylko przynależność do linii selekcyjnej miała wpływ na masę ciała matek. Samice z linii o wysokim BMR charakteryzowały się większą masą ciała w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii o niskim BMR ($P = 0,002$; Tabela 1). W ostatnim dniu laktacji, samice z linii H-BMR miały

masę ciała większą o około 34% w porównaniu do okresu poprzedzającego reprodukcję, w przypadku samic z linii L-BMR różnica ta wynosiła około 24%. Zależne od przynależności do linii selekcyjnej zmiany w masie ciała matek w okresie laktacji potwierdziła istotna statystycznie interakcja między czasem trwania eksperymentu i przynależnością do linii selekcyjnej ($P = 0,004$; Tabela 1). Istotna interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia pokazała też, że masa ciała matek z linii H-BMR była największa w temperaturze 23°C ($P = 0,03$; Tabela 1; Rycina 2). Poza przynależnością do linii selekcyjnej, temperatura otoczenia i golenie sierści nie miały wpływu na masę ciała matek podczas laktacji ($P > 0,1$ w obu przypadkach). Analiza wykazała też istotną statystycznie interakcję między czasem trwania eksperymentu a temperaturą otoczenia ($P = 0,0002$) oraz czasem trwania eksperymentu a goleniem sierści ($P = 0,002$; Tabela 1).

2-czynnikowa analiza wariancji ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykonana wyłącznie w obrębie temperatury 23°C potwierdziła zarówno wpływ przynależności do linii selekcyjnej na masę ciała (większą masę ciała miały matki z linii H-BMR; $F_{1,39} = 18,22$; $P = 0,0001$), jak i zmianę masy ciała matek w okresie laktacji ($F_{6,234} = 10,67$; $P < 0,0001$). Brak interakcji między czasem trwania eksperymentu a linią selekcyjną pokazuje, że w temperaturze 23°C, między 2 a 14 dniem laktacji zmiana masy ciała matek w obu liniach selekcyjnych była taka sama ($F_{6,234} = 1,49$; $P = 0,2$; Rycina 2A). Istotna statystycznie była natomiast interakcja między czasem trwania eksperymentu a goleniem, co pokazuje że usunięcie sierści miało wpływ na zmianę masy ciała matek podczas laktacji ($F_{6,234} = 2,35$; $P = 0,03$; Rycina 2A), jednak także w sposób niezależny od przynależności do linii selekcyjnej (brak interakcji między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem; $F_{1,39} = 0,14$; $P = 0,7$). Z kolei analizy wykonane w obrębie temperatury 30°C pokazały, że zarówno przynależność do linii selekcyjnej, jak i golenie, nie miały wpływu na masę ciała matek ($P > 0,5$ w obu przypadkach; Rycina 2B). Podobnie, jak w temperaturze 23°C, u samic latujących w 30°C obserwowałam zmiany w masie ciała w kolejnych dniach eksperymentu, chociaż efekt ten nie był tak silny, jak w przypadku temperatury kontrolnej ($F_{6,246} = 3,11$; $P = 0,006$; Rycina 2B). Istotna interakcja między czasem trwania eksperymentu a linią selekcyjną pokazała, że zmiana w masie ciała była większa u matek z wysokim BMR ($F_{6,246} = 2,88$; $P = 0,01$; Rycina 2B). Ponadto, większe zmiany w masie ciała zauważalne

były u matek golonych ($F_{6,246} = 2,44$; $P = 0,03$; Rycina 2B), bez względu na przynależność do linii selekcyjnej (brak interakcji między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem; ANOVA; $F_{1,41} = 0,004$; $P = 0,9$).

2.2.2. Różnice w temperaturze ciała matek

Do oceny zmian w temperaturze ciała samic w okresie 14-dniowej laktacji wykorzystałam 3-czynnikową analizę wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Analiza pokazała, że temperatura ciała zmieniała się w czasie laktacji ($P = 0,0002$; Tabela 1). Obserwowane w czasie zmiany w temperaturze ciała matek były takie same u matek z obu linii selekcyjnych (brak interakcji czas $\times$ linia selekcyjna; $P = 0,9$), takie same w obu temperaturach (brak interakcji czas $\times$ temperatura otoczenia; $P = 0,1$), takie same w grupie matek golonych i niepozdebawionych sierści (brak interakcji czas $\times$ golenie; $P = 0,3$; Tabela 1). Spośród trzech zmiennych niezależnych, tylko temperatura otoczenia miała wpływ na różnice w temperaturze ciała matek. Samice laktujące w temperaturze 30°C miały wyższą temperaturę ciała w porównaniu do matek umieszczonych w temperaturze kontrolnej ($P = 0,006$; Tabela 1; Rycina 3). Oprócz braku wpływu przynależności do linii selekcyjnej i golenia na temperaturę ciała matek, także żadna interakcja między zmiennymi niezależnymi nie była istotna statystycznie ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach; Tabela 1).

Z uwagi na silny wpływ temperatury otoczenia na temperaturę ciała matek, wykonałam analizy osobno w obrębie temperatury 23°C i 30°C. 2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykonana w obrębie temperatury 23°C pokazała, że temperatura ciała matek nie zmieniała się w czasie trwania eksperymentu ($F_{6,52} = 1,5$; $P = 0,2$; Rycina 3A). Nieistotne statystycznie okazały się również interakcje między czasem trwania eksperymentu a przynależnością do linii selekcyjnej ($F_{6,52} = 0,19$; $P = 0,9$) oraz czasem trwania eksperymentu a goleniem ($F_{6,52} = 1,87$; $P = 0,1$). Zaobserwowałam też, że temperatura ciała samic nie zależała od przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,8} = 2,84$; $P = 0,1$), jak również od golenia ($F_{1,8} = 0,21$; $P = 0,7$). Istotna statystycznie okazała się interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem ($F_{1,8} = 9,92$; $P = 0,01$). W temperaturze 23°C niegolone matki z linii H-BMR miały najwyższą temperaturę ciała (Rycina 3A).

W 30°C temperatura ciała samic zmieniała się w czasie laktacji ($F_{6,78} = 5,76$; $P < 0,0001$; Rycina 3B). Zmiany temperatury ciała matek w czasie były jednak takie same w obu liniach selekcyjnych (brak interakcji czas $\times$ linia selekcyjna; $F_{6,78} = 0,26$; $P = 0,9$), nie różniły się też między matkami golonymi i niepozbawionymi sierści (brak interakcji czas $\times$ golenie; $F_{6,78} = 0,29$; $P = 0,9$). Podobnie jak w temperaturze kontrolnej, w 30°C także zaobserwowałam istotną interakcję między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem, przy czym wyższą temperaturę ciała miały niegolone matki z linii L-BMR ($F_{1,12} = 9,24$; $P = 0,01$; Rycina 3B). Ponadto, w temperaturze 30°C zaobserwowałam pozytywną korelację między masą miotu a temperaturą ciała matek (Rycina 4B). Z rozkładu punktów na rycinie widać, że najwyższą temperaturę ciała miały matki z linii L-BMR, które wychowywały w temperaturze 30°C najcięższe mioty ($P < 0,0001$; $r = 0,54$). Analogiczna zależność nie występowała u laktujących samic wychowujących młode w temperaturze 23°C ($P = 0,5$; $r = 0,11$; Rycina 4A).

2.2.3. Różnice w konsumpcji pokarmu, strawności i ilości asymilowanej energii

Do oceny zmian w pobieraniu pokarmu zastosowałam 3-czynnikową analizę wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami (z tymi samymi trzema zmiennymi niezależnymi, jak powyżej). Analiza wykazała, że ilość pokarmu konsumowanego przez matki zmieniała się w czasie trwania eksperymentu ($P < 0,0001$; Tabela 1). Konsumpcja pokarmu zależała od temperatury otoczenia, zdecydowanie więcej jadły samice przetrzymywane w warunkach kontrolnych ($P < 0,0001$; Tabela 1). Obserwację tę dodatkowo potwierdza istotna statystycznie interakcja między czasem trwania eksperymentu a temperaturą otoczenia ($P = 0,0002$; Tabela 1; Rycina 5). Przynależność do linii selekcyjnej, jak również golenie sierści, nie miały wpływu na ilość pobieranego przez matki pokarmu ($P > 0,1$ w obu przypadkach; Tabela 1), ale istotna statystycznie interakcja tymi dwoma czynnikami pokazuje, że golone matki z linii H-BMR jadły więcej pokarmu ($P = 0,001$; Tabela 1).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykonana osobno dla obu temperatur potwierdziła trend widoczny w modelu głównym, ilość konsumowanego pokarmu zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($F_{5,165} = 6,36$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{5,175} = 4,10$; $P = 0,002$ dla 30°C; Rycina 5). Ponadto, w temperaturze 23°C wpływ na konsumpcję pokarmu miała procedura

golenia sierści ($F_{1,33} = 4,41$; $P = 0,04$; Rycina 5A). Jak pokazała interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem, w tej temperaturze najwięcej pokarmu jadły golone matki z linii H-BMR ($F_{1,33} = 12,92$; $P = 0,001$; Rycina 5A). Z kolei u matek poddanych ekspozycji do temperatury 30°C, konsumpcja pokarmu nie zależała od przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,35} = 0,03$; $P = 0,9$), jak również od golenia ($F_{1,35} = 0,10$; $P = 0,8$), interakcja między tymi czynnikami także nie była istotna ($F_{1,35} = 0,90$; $P = 0,3$; Rycina 5B).

3-czynnikowa analiza wariancji ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami pokazała, że strawność pokarmu zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($P < 0,00001$; Tabela 1). Zmiana w strawności pokarmu w czasie była większa u matek w temperaturze 23°C (interakcja między czasem trwania eksperymentu a temperaturą otoczenia; $P < 0,0001$; Tabela 1; Rycina 6). Oprócz temperatury otoczenia ($P < 0,0001$; Tabela 1), na strawność pokarmu miała też wpływ przynależność do linii selekcyjnej. Matki z niskim BMR nieco lepiej radziły sobie z trawieniem pokarmu w porównaniu do samic z linii H-BMR ($P = 0,04$; Tabela 1). Wpływ golenia na strawność pokarmu ($P = 0,3$), jak również interakcje między zmiennymi niezależnymi, nie były statystycznie istotne ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach, Tabela 1).

Jak pokazała 2-czynnikowa analiza wariancji ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, w temperaturze 23°C matki z linii L-BMR lepiej radziły sobie z trawieniem pokarmu w porównaniu do samic z linii H-BMR ($F_{1,35} = 4,63$; $P = 0,04$; Rycina 6A). W temperaturze 30°C strawność pokarmu nie zależała od przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,40} = 0,51$; $P = 0,5$; Rycina 6B), istotna statystycznie była natomiast interakcja między czasem trwania eksperymentu a przynależnością do linii selekcyjnej (zmiany w strawności pokarmu były większe u matek z niskim BMR w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii H-BMR ($F_{5,200} = 3,17$; $P = 0,009$; Rycina 6B)). W obu temperaturach efektywność trawienia pokarmu zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($F_{5,175} = 48,78$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{5,200} = 26,37$; $P < 0,0001$ dla 30°C). W obu temperaturach golenie nie miało wpływu na strawność pokarmu ($F_{1,35} = 0,03$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{1,40} = 1,73$; $P = 0,2$ dla 30°C), nieistotna okazała się również interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem ($P > 0,1$ w obu przypadkach).

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA pokazała, że ekspozycja matek do temperatury 30°C spowodowała redukcję ilości energii brutto pobieranej z pokarmu

(GEI; $F_{1,45} = 52,96$; $P < 0,0001$), redukcję ilości energii w odchodach (GE_{feaces} ; $F_{1,44} = 67,16$; $P < 0,0001$), obniżenie dziennego spożycia energii (DEI; $F_{1,46} = 42,65$; $P < 0,0001$) oraz obniżenie ilości energii przyswajanej z pokarmu (MEI; $F_{1,42} = 51,96$; $P < 0,0001$; Tabela 2).

Wartość GEI większa była u matek z linii H-BMR w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR ($F_{1,45} = 15,92$; $P = 0,0002$; Tabela 2). Interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia pokazała, że w temperaturze 23°C matki z linii H-BMR pobierały więcej energii brutto z pokarmu niż matki z linii L-BMR ($F_{1,44} = 7,94$; $P = 0,007$). Wpływ przynależności do linii selekcyjnej na wartość GEI potwierdziła też analiza wykonana tylko w obrębie temperatury 23°C (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,17} = 27,49$; $P < 0,0001$). U samic poddanych ekspozycji do temperatury 30°C, przynależność do linii selekcyjnej nie wpływała na ilość energii brutto pobieranej z pokarmu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,26} = 0,54$; $P = 0,5$). Golenie nie miało wpływu na wartość GEI w przypadku żadnej z wykonanych analiz (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,45} = 0,38$; $P = 0,5$; Tabela 2 oraz 2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,17} = 0,47$; $P = 0,5$ dla 23°C i $F_{1,26} = 1,97$; $P = 0,2$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,17} = 0,96$; $P = 0,3$ dla 23°C i $F_{1,26} = 0,01$; $P = 0,9$ dla 30°C).

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykazała, że matki z linii H-BMR charakteryzowały się wyższą zawartością energii w odchodach w porównaniu do samic z linii L-BMR ($F_{1,44} = 16,82$; $P = 0,0001$; Tabela 2). Interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia wskazuje, że większą wartość GE_{feaces} miały matki z wysokim BMR w temperaturze 23°C ($F_{1,44} = 13,32$; $P = 0,0007$). Porównania wykonane w obrębie temperatury 23°C pokazały, że u matek z linii H-BMR ilość energii w odchodach była wyższa niż u samic z linii L-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,16} = 38,56$; $P < 0,0001$). Przynależność do linii selekcyjnej nie miała wpływu na wartość GE_{feaces} u samic wychowujących młode w temperaturze 30°C (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,26} = 0,39$; $P = 0,5$). W modelu głównym (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,5$; Tabela 2), jak również w analizach wykonanych oddzielnie dla każdej z temperatur, golenie sierści nie miało wpływu na zawartość energii w odchodach matek (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,16} = 0,13$; $P = 0,7$ dla 23°C i $F_{1,26} = 0,94$; $P = 0,3$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$

golenie nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,16} = 0,0005$; $P = 0,9$ dla 23°C i $F_{1,26} = 0,01$; $P = 0,9$ dla 30°C).

Matki z linii H-BMR charakteryzowały się wyższym dziennym spożyciem energii (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,46} = 11,59$; $P = 0,001$; Tabela 2). Interakcja linia selekcyjna $\times$ temperatura otoczenia ujawniła, że najwyższa wartość DEI utrzymywała się u matek z wysokim BMR w temperaturze 23°C (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,46} = 4,33$; $P = 0,04$). Wpływ przynależności do linii selekcyjnej na wartość DEI istotny był tylko w temperaturze 23°C (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 14,56$; $P = 0,001$ dla 23°C i $F_{1,26} = 0,55$; $P = 0,5$ dla 30°C). Zarówno w modelu głównym (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,46} = 0,85$; $P = 0,4$; Tabela 2), jak również w temperaturze 23°C i 30°C , golenie sierści matek nie wpływało na wartość DEI (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,17} = 0,01$; $P = 0,9$ dla 23°C i $F_{1,26} = 2,23$; $P = 0,1$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,17} = 0,37$; $P = 0,6$ dla 23°C i $F_{1,26} = 0,0009$; $P = 0,9$ dla 30°C).

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykazała, że samice z linii H-BMR przyswajały z pokarmu więcej energii w porównaniu do samic z linii o niskim BMR ($F_{1,42} = 11,05$; $P = 0,002$; Tabela 2). Jak ujawniła interakcja linia selekcyjna $\times$ temperatura otoczenia, wartość MEI była najwyższa u matek z wysokim BMR w temperaturze 23°C ($F_{1,42} = 5,20$; $P = 0,03$). 2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykonana oddzielnie dla 23°C i 30°C potwierdziła wpływ przynależności do linii selekcyjnej na wartość MEI tylko w temperaturze kontrolnej ($F_{1,18} = 14,55$; $P = 0,001$ dla 23°C oraz $F_{1,22} = 0,10$; $P = 0,8$ dla 30°C ; Rycina 7A i 7B). Zarówno w modelu głównym (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,42} = 0,21$; $P = 0,6$; Tabela 2), jak i w analizach wykonanych dla obu temperatur oddzielnie, golenie sierści nie wpływało na ilość energii przyswajanej przez matki z pokarmu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 0,01$; $P = 0,9$ dla 23°C i $F_{1,22} = 0,95$; $P = 0,3$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie nie była istotna statystycznie w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 0,37$; $P = 0,6$ dla 23°C i $F_{1,22} = 1,18$; $P = 0,3$ dla 30°C).

2.2.4. Różnice w dziennych wydatkach energetycznych i ilości energii w mleku

Na wielkość dziennych wydatków energetycznych (DEE) laktujących samic istotny wpływ miała temperatura otoczenia oraz przynależność do linii selekcyjnej (3-

czynnikiem ANCOVA; ($F_{1,42} = 52,41$; $P < 0,0001$ oraz $F_{1,42} = 21,77$; $P < 0,0001$; Tabela 2). Ekspozycja matek do temperatury 30°C skutkowała zmniejszeniem ich dziennych wydatków energetycznych o około 22% w porównaniu do matek przetrzymywanych w temperaturze kontrolnej (Tabela 2). Niezależnie od efektu temperatury otoczenia, matki z linii H-BMR miały poziom DEE wyższy od samic z niskim BMR (Tabela 2). Interakcja między tymi czynnikami nie była statystycznie istotna ($P > 0,1$). Analiza wykonana osobno dla 23°C i 30°C ujawniła, że poziom DEE matek zależał od przynależności do linii selekcyjnej w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 19,57$; $P = 0,0003$ dla 23°C oraz $F_{1,22} = 8,04$; $P = 0,01$ dla 30°C; Rycina 8). Zarówno w modelu głównym (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,42} = 0,20$; $P = 0,7$; Tabela 2), jak i w analizach wykonanych oddzielnie dla każdej z dwóch temperatur, nie potwierdziłam wpływu golenia sierści na wielkość dziennych wydatków energetycznych matek ($F_{1,18} = 0,61$; $P = 0,4$ dla 23°C oraz $F_{1,22} = 0,0006$; $P = 0,9$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie nie była istotna statystycznie w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 0,02$; $P = 0,9$ dla 23°C i $F_{1,22} = 0,47$; $P = 0,5$ dla 30°C).

Ilość energii zawartej w mleku (MEO) była wyższa u matek wychowujących potomstwo w 23°C w porównaniu do matek w temperaturze 30°C (3-czynnikowa ANCOVA, $F_{1,42} = 6,13$; $P = 0,02$; Tabela 2). Przynależność do linii selekcyjnej (3-czynnikowa ANCOVA, $F_{1,42} = 0,02$; $P = 0,9$; Tabela 2) oraz usuwanie sierści nie miały wpływu na wartość MEO (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,42} = 0,72$; $P = 0,4$; Tabela 2). Wpływ przynależności do linii selekcyjnej na wartość MEO okazał się być istotny tylko w grupie matek wychowujących młode w temperaturze 30°C. W tych warunkach, matki z linii L-BMR produkowały mleko o wyższej zawartości energii niż u ich odpowiedniczek z linii H-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,22} = 5,38$; $P = 0,03$; Rycina 9B). W temperaturze 23°C nie obserwowałam międzyliniowych różnic w ilości energii zawartej w mleku matek (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 2,11$; $P = 0,2$; Rycina 9A). Zarówno w temperaturze 23°C, jak i 30°C, golenie sierści nie miało wpływu na wartość MEO u matek z obu linii selekcyjnych (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 0,13$; $P = 0,7$ dla 23°C oraz $F_{1,22} = 1,5$; $P = 0,2$ dla 30°C; Rycina 9). Interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie nie była istotna statystycznie w obu temperaturach (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,18} = 0,35$; $P = 0,6$ dla 23°C i $F_{1,22} = 0,47$; $P = 0,5$ dla 30°C).

2.2.5. Różnice w tempie przyrostu masy miotów

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykazała, że masa miotów zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($P = 0,02$; Tabela 1). Istotna interakcja między czasem trwania eksperymentu a przynależnością do linii selekcyjnej wskazała na większe zmiany w masie miotów matek charakteryzujących się niskim BMR ($P = 0,01$, Tabela 1). Co więcej, istotna interakcja między czasem trwania eksperymentu a goleniem sugeruje, że masa miotów wychowywanych przez niegolone matki z obu linii selekcyjnych zmieniała się w czasie laktacji szybciej niż masa miotów samic pozbawionych sierści ($P = 0,008$; Tabela 1). Spośród trzech zmiennych niezależnych, przynależność do linii selekcyjnej oraz temperatura otoczenia miały wpływ na tempo przyrostu masy miotów (Tabela 1). Przyrost masy miotów matek z linii L-BMR był większy w porównaniu do miotów wychowywanych przez matki z wysokim BMR ($P = 0,004$; Tabela 1). Niezależnie od efektu linii selekcyjnej, szybciej przyrastały mioty wychowywane w temperaturze 30°C w porównaniu do 23°C ($P = 0,0006$). O ile, golenie sierści nie wpływało na tempo przyrostu masy miotu ($P = 0,9$; Tabela 1), istotna interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem sugerowała szybszy przyrost masy miotów wychowywanych przez niegolone matki z niskim BMR ($P = 0,04$; Tabela 1).

Porównania wykonane osobno dla obu temperatur pokazały, że masa miotów wychowywanych w 23°C zmieniała się w kolejnych dniach laktacji (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,150} = 4,03$; $P = 0,002$; Rycina 10A). Przyrost masy miotów w tej temperaturze nie zależał od przynależności do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,30} = 2,13$; $P = 0,2$) ani od golenia sierści (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,30} = 0,37$; $P = 0,5$; Rycina 10A). Podobnie, jak w modelu głównym, w temperaturze 23°C utrzymywała się interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem, jednak kierunek zależności był inny. W temperaturze 23°C lepiej przyrastały mioty golonych matek z linii H-BMR (2 -czynnikowa ANCOVA; $F_{1,30} = 4,59$; $P = 0,04$; Rycina 10A). Z kolei w 30°C tempo przyrostu masy miotu zależało od przynależności do linii selekcyjnej, przy czym najszybciej przyrastały mioty matek z linii L-BMR w porównaniu do matek z linii H-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,34} = 5,40$; $P = 0,03$; Rycina 10B). Istotna interakcja między czasem trwania eksperymentu a goleniem pokazała, że zmiany w masie miotów

wychowywanych przez matki niegolone były większe w kolejnych dniach eksperymentu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,170} = 2,52$; $P = 0,03$; Rycina 10B).

2.2.6. Różnice w masie narządów wewnętrznych

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykazała, że samice z linii H-BMR mają większą masę nerek ($F_{1,80} = 101,95$; $P < 0,0001$), jelita cienkiego ($F_{1,78} = 50,35$; $P < 0,0001$), serca ($F_{1,78} = 21,79$; $P < 0,0001$) oraz wątroby ($F_{1,78} = 27,56$; $P < 0,0001$), podczas gdy myszy z linii L-BMR charakteryzują się większą masą brunatnej tkanki tłuszczowej ($F_{1,70} = 151,19$; $P < 0,0001$; Tabela 3). Ekspozycja do wysokiej temperatury otoczenia miała wpływ jedynie na masę nerek, powodując redukcję ich masy w porównaniu do wartości obserwowanych w warunkach kontrolnych ($F_{1,80} = 15,87$, $P = 0,0006$; Tabela 3). W przypadku masy nerek i jelita cienkiego zaobserwowałam istotną interakcję między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia. Masa obu narządów była większa u matek z linii H-BMR w temperaturze 23°C ($F_{1,80} = 4,28$, $P = 0,04$ w przypadku masy nerek oraz $F_{1,78} = 5,74$, $P = 0,02$ w przypadku masy jelita cienkiego). Golenie sierści nie miało wpływu na masę badanych narządów ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach; Tabela 3).

Po wykonaniu analiz osobno dla obu temperatur zaobserwowałam, że na masę jelita cienkiego w temperaturze 30°C miała wpływ przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,39} = 16,24$; $P = 0,0003$), jak również golenie sierści (2-czynnikowa ANCOVA, $F_{1,39} = 5,41$; $P = 0,03$; Rycina 11B). Istotna interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem pokazała, że największą masę jelita cienkiego w temperaturze 30°C miały golone matki z linii H-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,39} = 6,92$, $P = 0,01$; Rycina 11B). Poza efektem przynależności do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA, $F_{1,37} = 29,16$, $P < 0,0001$; Rycina 11A), golenie sierści (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,37} = 0,04$, $P = 0,8$), jak również interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem, nie były istotne w temperaturze 23°C (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,37} = 0,04$, $P = 0,9$; Rycina 11A).

Zarówno w temperaturze 23°C, jak i 30°C, masa nerek, serca i wątroby większa była u matek z linii o wysokim BMR ($P < 0,03$ we wszystkich przypadkach). Odwrotny trend występował w przypadku masy brunatnej tkanki tłuszczowej, większą masę narządu obserwowałam u matek z linii L-BMR ($P < 0,0001$ w obu temperaturach).

Golenie sierści nie wpływało na masę nerek, serca, wątroby i brunatnej tkanki tłuszczowej ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach). W przypadku wymienionych narządów, nieistotna statystycznie była też interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a goleniem ($P > 0,1$ w obu temperaturach).

2.3. Dyskusja

Eksperyment 1 miał pokazać, jak usuwanie warstwy izolacyjnej wpłynie na tempo wzrostu potomstwa matek różniących się nie tylko podstawowymi kosztami utrzymania organizmu (Książek i in. 2004 i 2005, Konarzewski i Książek 2013), ale też intensywnością opieki rodzicielskiej (Sadowska i in. 2013 i 2015). Jeśli założenia hipotezy HDL są słuszne, wysiłek reprodukcyjny matek powinien być ograniczany przez ich indywidualne zdolności do rozpraszania metabolicznego ciepła (Król i Speakman 2003a). Efekt ten powinien być szczególnie zauważalny w wysokiej temperaturze otoczenia, gdzie z uwagi na mały gradient temperatur między organizmem a środowiskiem, usuwanie ciepła może być utrudnione. Golenie miało służyć uwalnianiu laktujących samic od tych trudności i skutkować podniesieniem intensywności opieki rodzicielskiej, wynikiem czego powinno być szybsze tempo wzrostu młodych. Spodziewałam się, że w temperaturze 30°C trudności w rozpraszaniu ciepła będą bardziej dotkliwe dla matek z linii H-BMR, ze względu na już i tak wysokie wydatki energetyczne związane z utrzymaniem wysokiego BMR (w porównaniu do samic z linii L-BMR), które dodatkowo potęgowane będą przez opiekę nad potomstwem. Zakładałam, że skutki podniesienia indywidualnych predyspozycji samic do rozpraszania ciepła poprzez usunięcie sierści będą silniej manifestowane właśnie u matek z linii H-BMR.

Zebrane dane pokazały, że odpowiedź matek z przeciwnych linii selekcyjnych na eksperymentalne usuwanie warstwy izolacyjnej zależała od temperatury otoczenia, w jakiej wychowywały swoje młode. W temperaturze 23°C, matki z linii H-BMR charakteryzowały się większą masą ciała niż ich odpowiedniczki z linii o niskim BMR. Golenie sierści powodowało wzrost masy ciała matek w czasie trwania laktacji, wzrost ten był jednak taki sam w obu liniach selekcyjnych (interakcja czas trwania eksperymentu $\times$ golenie; Rycina 2A). Usunięcie sierści zwiększyło też ilość konsumowanego pokarmu u matek z obu linii selekcyjnych, przy czym efekt ten był

najlepiej widoczny u golonych matek z linii H-BMR (interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie; Rycina 5A). Wynik ten korespondował z szybszym przyrostem masy miotów pozbawionych sierści matek z wysokim BMR (interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie; Rycina 10A). Pomimo tego, że konsumpcja pokarmu i masy miotów golonych matek z linii H-BMR rosły w temperaturze 23°C, efektywność trawienia pokarmu, jak również ilość energii asymilowanej z pokarmu (MEI) oraz dzienne wydatki energetyczne (DEE) w szczycie laktacji nie były większe w grupie matek golonych w porównaniu do matek niepozbawionych sierści w linii H-BMR (Rycina 6A, 7A i 8A). Co ciekawe, w szczycie laktacji przyrostowi masy miotów w grupie matek golonych z wysokim BMR nie towarzyszyła większa zawartość energii w mleku (MEO; Rycina 9A). Co więcej, wartość MEO była taka sama u matek z przeciwnych linii selekcyjnych w temperaturze 23°C ($F_{1,18} = 2,11$; $P = 0,2$; Rycina 9A). Rycina 5A pokazuje, że na usunięcie sierści, laktujące w 23°C matki z linii L-BMR także zareagowały zwiększeniem ilości konsumowanego pokarmu w czasie laktacji, chociaż efekt ten był najslabiej manifestowany w porównaniu do pozostałych grup matek (Rycina 5A). Golone matki z niskim BMR słabiej radziły sobie z opieką nad potomstwem (Rycina 10A). Podobnie, jak u samic z wysokim BMR, golenie sierści u matek z linii L-BMR także nie miało wpływu na strawność pokarmu podczas laktacji (Rycina 6A), nie powodowało asymilowania większej ilości energii z pokarmu (MEI; Rycina 7A), nie podnosiło wydatków energetycznych (DEE; Rycina 8A) oraz nie wpływało na zawartość energii w mleku (MEO; Rycina 9A) w porównaniu do matek z linii L-BMR niepozbawionych sierści.

Wyniki zebrane dla samic wychowujących mioty w temperaturze 23°C częściowo korespondują z rezultatami innych badań, wykorzystujących golenie jako narzędzie do testowania założeń hipotezy HDL. Usuwanie sierści matkom z linii H-BMR skutkowało szybszym przyrostem masy ich miotów, co było zgodne z wcześniejszymi obserwacjami u laktujących gryzoni (np. Król i in. 2007, Sadowska i in. 2016, Ohrnberger i in. 2020). Jednak w przytoczonych pracach, efekt ten związany był ze wzrostem zawartości energii w mleku matek, czego nie zaobserwowałam u matek charakteryzujących się wysokim BMR w przypadku Eksperymentu 1. Z drugiej strony, golone matki z linii L-BMR miały taką samą kaloryczność mleka (MEO) w temperaturze 23°C, jak golone samice z linii H-BMR, przy czym wychowywały one mniejsze mioty w porównaniu do swoich odpowiedniczek z linii H-BMR.

W temperaturze 30°C matki z przeciwnych linii selekcyjnych nie różniły się masą ciała (Rycina 2B). Masa ciała samic w 30°C była taka sama, jak w temperaturze 23°C (Tabela 1). Masa ciała matek w 30°C zmieniała się w czasie, golenie sierści skutkowało zauważalnymi zmianami w masie ciała golonych matek z obu linii selekcyjnych (Rycina 2B). Konsumpcja pokarmu w 30°C była niższa w porównaniu do temperatury kontrolnej (Tabela 1), matki z obu linii selekcyjnych jadły tyle samo, bez względu na to, czy były pozbawione sierści, czy też nie (Rycina 5B). Efektywność trawienia pokarmu była lepsza w 30°C, niż w 23°C (Tabela 1), lepiej radziły sobie golone i niegolone matki z linii L-BMR (Rycina 6B). Golenie sierści nie miało wpływu na wartość MEI, DEE oraz MEO, przy czym ilość asymilowanej z pokarmu energii była taka sama w obu liniach selekcyjnych (Rycina 7B), dzienne wydatki energetyczne były większe u matek z linii H-BMR (Rycina 8B), natomiast to matki z linii L-BMR produkowały mleko o wyższej kaloryczności w porównaniu do matek z linii H-BMR (Rycina 9B). Tempo przyrostu masy miotów w temperaturze 30°C było zdecydowanie większe niż w warunkach kontrolnych (Tabela 1), ale golenie sierści nie miało wpływu na przyrost masy miotów. Szybciej przyrastały mioty wychowywane przez golone i niegolone matki z linii L-BMR (Rycina 10B). Zebrane dane nie są spójne z wynikami innej pracy, w której laktujące w temperaturze 30°C samice nornika zwyczajnego poddano procedurze golenia, obserwując przy tym szybsze tempo wzrostu potomstwa, któremu nie towarzyszyło zwiększenie kaloryczności produkowanego mleka (Simons i in. 2011).

Ekspozycja matek i ich potomstwa do temperatury otoczenia 30°C, skutkowała szybszym przyrostem masy miotów w porównaniu do warunków kontrolnych, ale również wzrostem temperatury ciała w okresie laktacji, zarówno u matek z niskim, jak i wysokim BMR (Tabela 1; Rycina 3B). W obu temperaturach istotna była interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie (Rycina 3). W 23°C temperatura ciała nie zmieniała się podczas laktacji i była wyższa u niegolonych samic z linii H-BMR (Rycina 3A). Przyrost masy miotów w tej temperaturze także był większy u matek z wysokim BMR, z tym że obserwowałam go u samic pozbawionych sierści (interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie; Rycina 10A). Wynik ten sugeruje, że usunięcie warstwy izolacyjnej uwolniło matki z wysokim BMR od trudności w pozbywaniu się metabolicznego ciepła, co przełożyło się na intensywniejszą opiekę rodzicielską i szybsze tempo wzrostu młodych. Pozbawione sierści matki z linii L-BMR słabiej radziły sobie z opieką nad potomstwem w 23°C

(podobnie, jak w pracy Sadowska i in. 2019 na tym samym modelu zwierzęcym), co może oznaczać, że w tej temperaturze matki z niskim BMR obciążone były kosztami własnej termoregulacji, przez co zmuszone były inwestować energię w utrzymanie stałej temperatury ciała, kosztem ograniczenia energii przeznaczonej na opiekę nad młodymi (Rycina 10A). W 30°C najwyższą temperaturę ciała obserwowałam natomiast u niegolonych matek z linii L-BMR (Rycina 3B). Tempo przyrostu masy miotów matek z tej linii także było najwyższe w temperaturze 30°C, jednakowe w grupie matek golonych i niepozdebawionych sierści (Rycina 10B). Wygląda na to, że ekspozycja matek z linii L-BMR do tej temperatury 'odciążała' ich budżety energetyczne, nie musiały produkować ciepła, by utrzymać temperaturę ciała, dzięki czemu mogły inwestować energię w opiekę nad młodymi. Ponadto, w temperaturze 30°C obserwowałam pozytywną korelację między masą miotu a temperaturą ciała matek. Z rozkładu punktów na rycinie widać, że pojedyncze matki z niskim BMR, wychowujące jednocześnie najcięższe mioty, miały także najwyższą temperaturę ciała (Rycina 4B). Wyniki te wskazują na akumulację ciepła w ciałach matek obciążonych opieką nad młodymi (silniej w 30°C) i są zbieżne z wynikami innych prac (np. Wen i in. 2017, Deng i in. 2020).

Masa narządów wewnętrznych (z wyjątkiem brunatnej tkanki tłuszczowej) była większa u samic z wysokim tempem metabolizmu (Sadowska i in. 2013, Książek i Konarzewski 2016; Tabela 3). Ten sam trend w międzyliniowych różnicach w masie narządów utrzymywał się w temperaturze 23°C i 30°C. Usunięcie sierści wpłynęło jedynie na zmianę masy jelita cienkiego, tylko u matek laktujących w 30°C (interakcja linia selekcyjna $\times$ golenie; Rycina 11A). W tej temperaturze masa jelita cienkiego była największa u golonych matek z linii H-BMR (Rycina 11A). Spodziewałam się też, że matki zredukują masę narządów wewnętrznych w wysokiej temperaturze otoczenia. Pozwoliłoby to im na ograniczenie ilości ciepła generowanego w wyniku aktywności narządów metabolicznych (Roff 2002, Pigliucci 2005, Książek i in. 2009). Wyniki pokazały jednak, że ekspozycja do temperatury 30°C skutkowałą zmniejszeniem tylko masy nerek, pozostałe narządy wewnętrzne były podobnej wielkości, jak u matek laktujących w 23°C (Tabela 3). Obserwacja ta może sugerować, że ekspozycja do temperatury 30°C nie generowała aż tak dużych ilości metabolicznego ciepła z pracy

narządów i nie stanowiła aż tak dużego obciążenia dla laktujących matek, jak początkowo zakładałam.

Podsumowując, wyniki Eksperymentu 1 pokazują, że samice myszy laboratoryjnych selekcjonowane w kierunku rozbieżnego tempa metabolizmu podstawowego inaczej radzą sobie z wysiłkiem rodzicielskim w temperaturze kontrolnej i w 30°C. W temperaturze 23°C przyrost masy miotów był większy u pozbawionych sierści matek z linii H-BMR. Jak się spodziewałam, ekspozycja matek z wysokim BMR do wysokiej temperatury otoczenia ograniczyła ich wysiłek rodzicielski. Inaczej, niż zakładałam, w temperaturze 30°C szybciej przyrastały mioty matek z linii L-BMR, a nie mioty matek pozbawionych sierści z linii H-BMR. Co ważne, nawet bez efektu golenia wysiłek rodzicielski matek z niskim BMR był wyższy w porównaniu do matek z linii H-BMR laktujących w tej samej temperaturze. Usunięcie sierści uwalniało matki od trudności w rozpraszaniu metabolicznego ciepła, ale tylko w temperaturze 23°C i tylko u samic charakteryzujących się wysokim BMR. Wyniki uzyskane w Eksperymentcie 1 tylko częściowo dostarczają poparcia dla założeń hipotezy HDL.

2.4. Tabele i ryciny

Tabela 1. Wyniki 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów w powtórzonych pomiarach z przynależnością do linii selekcyjnej, ekspozycją do temperatury 30°C i goleniem jako zmiennymi niezależnymi oraz wpływem czasu trwania eksperymentu na zmiany masy ciała, temperatury ciała, konsumpcji i strawności pokarmu oraz tempa przyrostu masy miotów u laktujących samic myszy laboratoryjnych (masa miotu jako zmienna ciągła w analizie różnic w temperaturze ciała oraz liczba młodych w miocie jako zmienna ciągła w analizie różnic w konsumpcji pokarmu i przyroście masy miotów).

	zmienne zależne									
	masa ciała		temperatura ciała		konsumpcja pokarmu		strawność pokarmu		tempo przyrostu masy miotu	
	F _{d,f}	P	F _{d,f}	P	F _{d,f}	P	F _{d,f}	P	F _{d,f}	P
linia	10,12 _{1,80}	0,002 (+)	2,69 _{1,21}	0,1	0,83 _{1,75}	0,4	4,52 _{1,75}	0,04 (-)	9,28 _{1,71}	0,004 (-)
temperatura	0,24 _{1,80}	0,6	9,48 _{1,21}	0,006 (-)	69,24 _{1,75}	<0,0001 (+)	52,53 _{1,75}	<0,0001 (-)	12,82 _{1,71}	0,0006 (-)
golenie	0,79 _{1,80}	0,4	0,21 _{1,21}	0,7	1,85 _{1,75}	0,2	0,98 _{1,75}	0,3	0,0006 _{1,71}	0,9
linia*temperatura	4,76 _{1,80}	0,03	0,01 _{1,21}	0,9	2,03 _{1,75}	0,2	1,43 _{1,75}	0,2	1,01 _{1,71}	0,3
linia*golenie	0,03 _{1,80}	0,9	0,26 _{1,21}	0,6	10,52 _{1,75}	0,001	0,46 _{1,75}	0,5	4,28 _{1,71}	0,04
golenie*temperatura	0,001 _{1,80}	0,9	0,53 _{1,21}	0,5	1,93 _{1,75}	0,2	0,51 _{1,75}	0,5	1,37 _{1,71}	0,2
czas	12,68 _{6,480}	<0,0001	4,67 _{6,142}	0,0002	8,15 _{5,375}	<0,0001	73,03 _{5,375}	<0,0001	2,85 _{5,355}	0,02
czas*linia	3,18 _{6,480}	0,004	0,16 _{6,142}	0,9	2,11 _{5,375}	0,06	2,19 _{5,375}	0,06	2,93 _{5,355}	0,01
czas*temperatura	4,45 _{6,480}	0,0002	1,84 _{6,142}	0,1	4,93 _{5,375}	0,0002	5,05 _{5,375}	<0,0001	1,79 _{5,355}	0,1
czas*golenie	3,48 _{6,480}	0,002	1,22 _{6,142}	0,3	1,13 _{5,375}	0,3	1,11 _{5,375}	0,4	3,18 _{5,355}	0,008

Wartość $P \leq 0,05$ oznaczona jest pogrubioną czcionką.

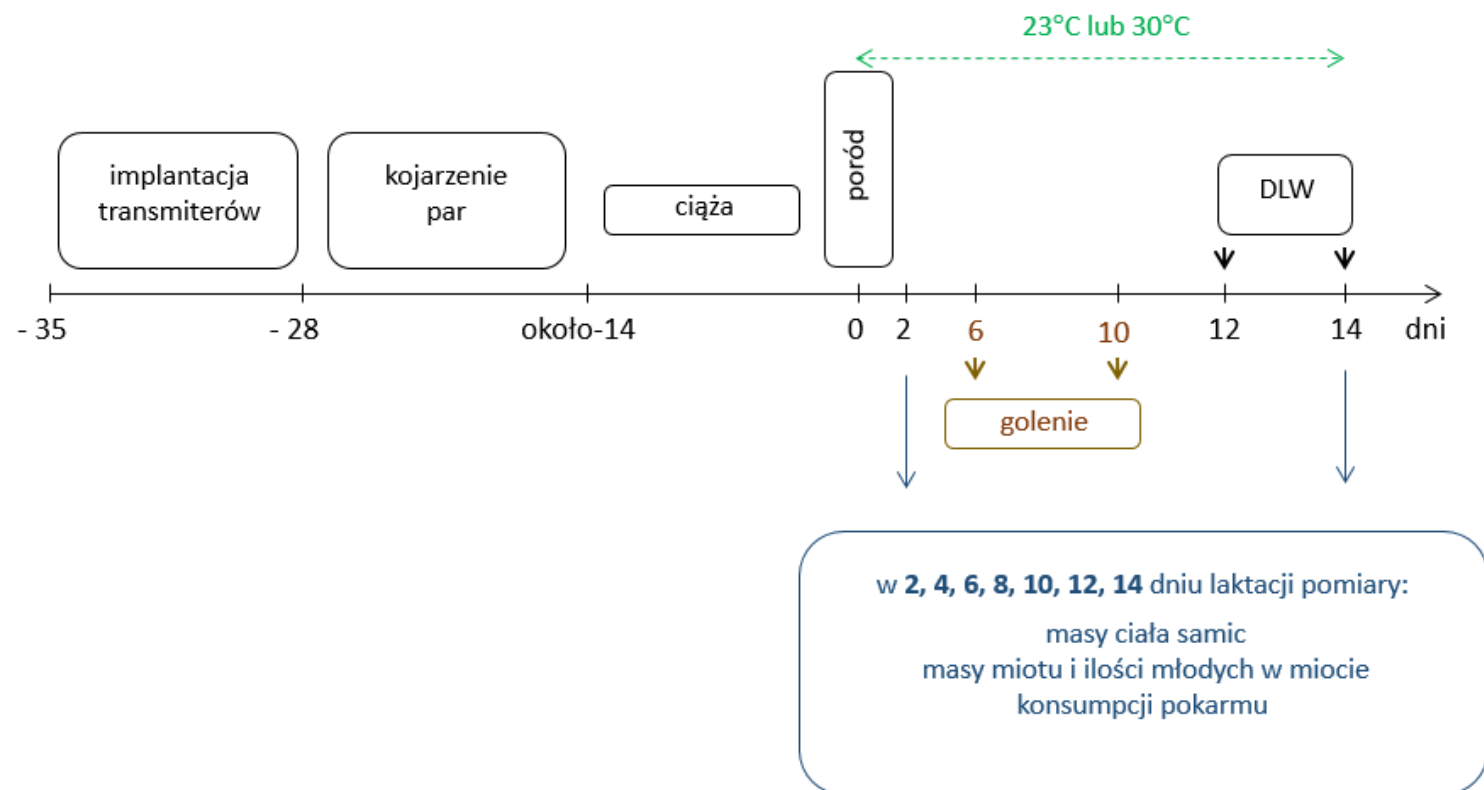
Znak (+) przy wartości P oznacza: H-BMR > L-BMR i 23°C > 30°C; natomiast znak (-) oznacza: L-BMR > H-BMR i 30°C > 23°C.

Tabela 2. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz golenia na codzienne spożycie energii (DEI; *Daily Energy Intake*), ilość energii brutto pobieranej z pokarmu (GEI; *Gross Energy Intake*), zawartość energii w odchodach (GE_{feaces}; *Gross Energy of feaces*), ilość energii asymilowanej z pokarmu (MEI; *Metabolisable Energy Intake*), codzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*) i kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) u laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA ± SE (błąd standardowy) i korygowane o przyrost masy miotów między 12 a 14 dniem laktacji.

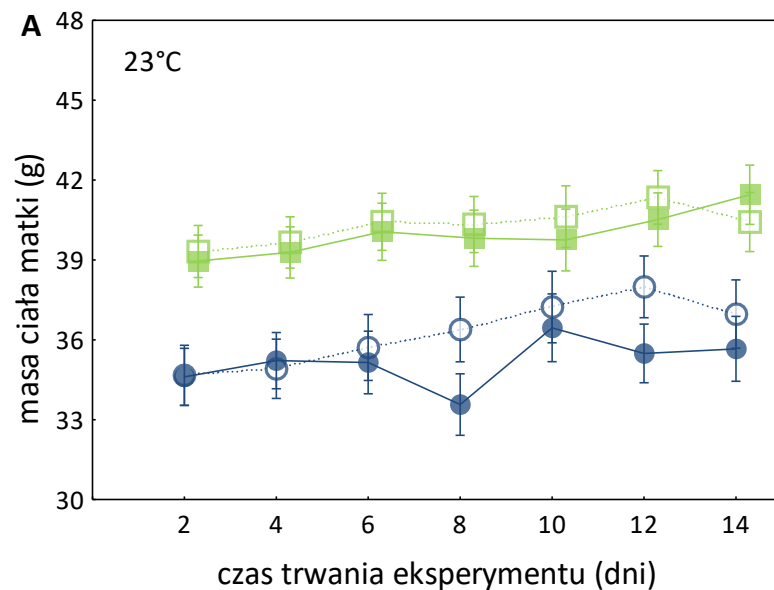
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	golenie	brak golenia
DEI	191,19 ± 7,16	181,99 ± 4,81	206,41 ± 5,56	171,5 ± 4,67	188,42 ± 5,60	183,92 ± 6,65
GEI	241,32 ± 9,74	225,71 ± 5,99	261,74 ± 7,39	213,24 ± 6,11	234,82 ± 7,42	231,62 ± 9,06
GE _{feaces}	49,31 ± 2,76	45,36 ± 1,47	55,36 ± 1,93	41,65 ± 1,51	46,98 ± 1,87	47,40 ± 2,45
MEI	185,87 ± 7,21	175,34 ± 3,94	200,21 ± 5,39	163,91 ± 3,93	180,10 ± 5,47	181,26 ± 6,46
DEE	103,37 ± 3,91	89,31 ± 2,75	109,53 ± 2,61	85,11 ± 2,75	95,38 ± 3,26	97,56 ± 4,18
MEO	82,50 ± 4,02	86,03 ± 3,50	90,68 ± 4,12	78,80 ± 3,13	84,71 ± 3,77	83,70 ± 3,73

Tabela 3. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz golenia na masę narządów aktywnych metabolicznie u laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) i korygowane o masę matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę treści jelitowej i masę analizowanego narządu.

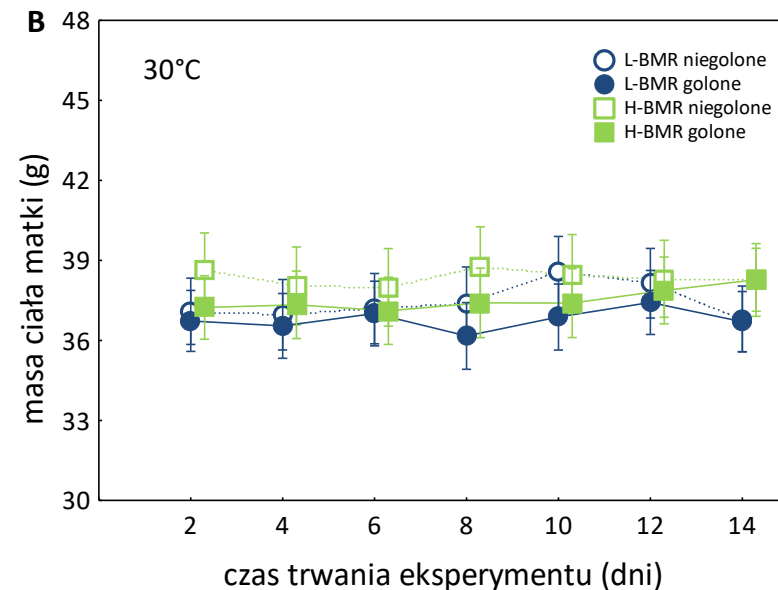
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	golenie	brak golenia
nerki	0,527 $\pm$ 0,010	0,404 $\pm$ 0,008	0,497 $\pm$ 0,014	0,438 $\pm$ 0,010	0,472 $\pm$ 0,012	0,462 $\pm$ 0,014
jelito	3,161 $\pm$ 0,101	2,311 $\pm$ 0,059	2,915 $\pm$ 0,124	2,603 $\pm$ 0,082	2,840 $\pm$ 0,109	2,667 $\pm$ 0,103
serce	0,178 $\pm$ 0,003	0,159 $\pm$ 0,003	0,172 $\pm$ 0,003	0,165 $\pm$ 0,003	0,172 $\pm$ 0,003	0,165 $\pm$ 0,003
wątroba	2,116 $\pm$ 0,067	1,672 $\pm$ 0,031	2,005 $\pm$ 0,071	1,812 $\pm$ 0,054	1,959 $\pm$ 0,059	1,848 $\pm$ 0,068
IBAT	0,033 $\pm$ 0,001	0,061 $\pm$ 0,002	0,048 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,003	0,048 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,003



Rycina 1. Schemat przebiegu Eksperymentu 1, w którym laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR poddane były ekspozycji do temperatury 30°C i pozbawione warstwy izolacyjnej w postaci sierści. Opis ryciny znajduje się w tekście (Rozdział 2).

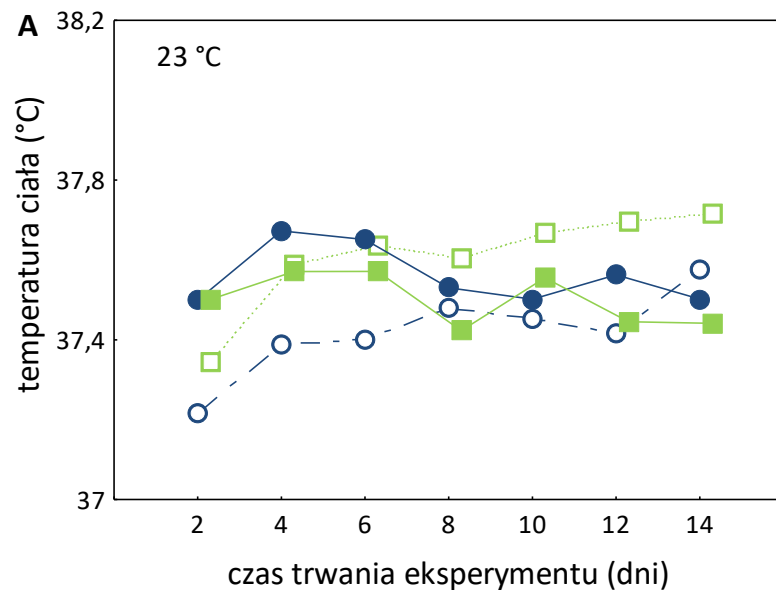


$P_{LINIA} = 0,0001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$
 $P_{CZAS * GOLENIE} = 0,03$

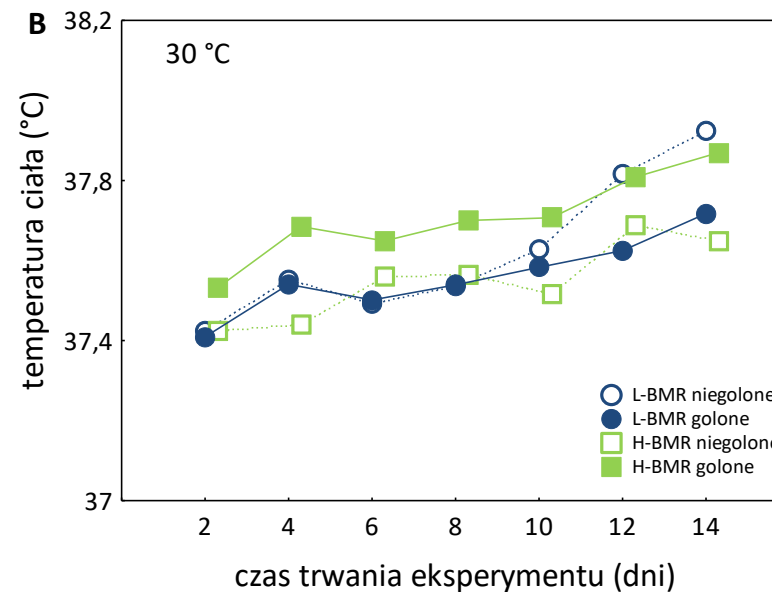


$P_{CZAS} = 0,006$
 $P_{CZAS * LINIA} = 0,01$
 $P_{CZAS * GOLENIE} = 0,03$

Rycina 2. Zmiany masy ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Części samic z przeciwnych linii selekcyjnych usunięto warstwę izolacyjną (sierść). Zmiany masy ciała wyrażone są jako wartości absolutne z analizy wariacji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.



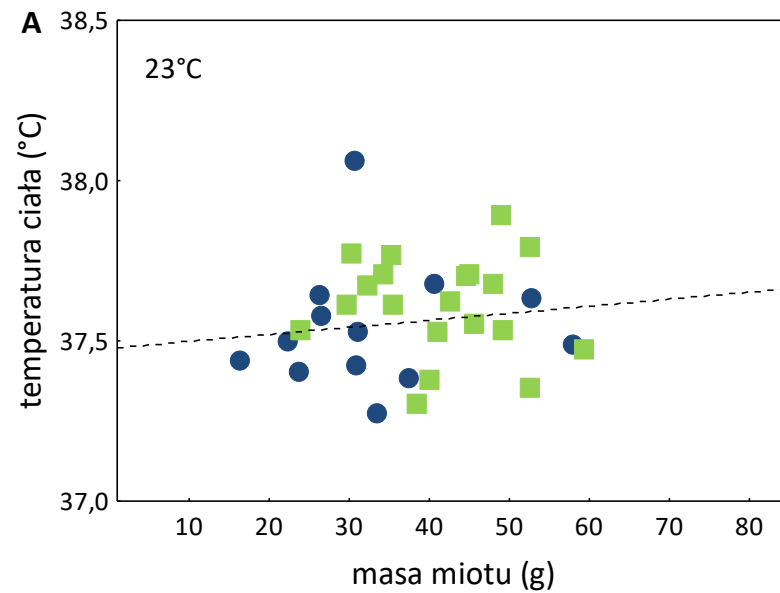
$P_{LINIA*GOLENIE} = 0,01$



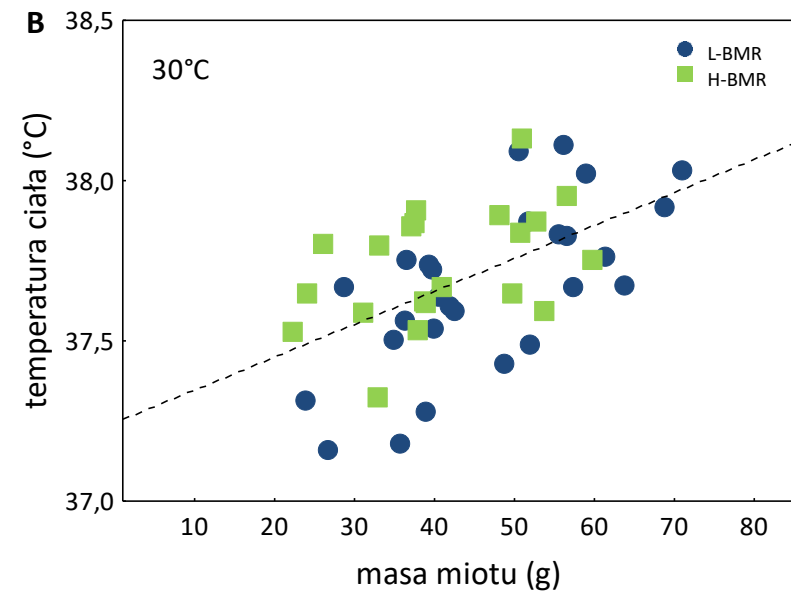
$P_{LINIA*GOLENIE} = 0,01$

$P_{CZAS} < 0,0001$

Rycina 3. Zmiany temperatury ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Części samic z przeciwnych linii selekcyjnych usunięto warstwę izolacyjną (sierść). Temperatura ciała wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o masę miotu).

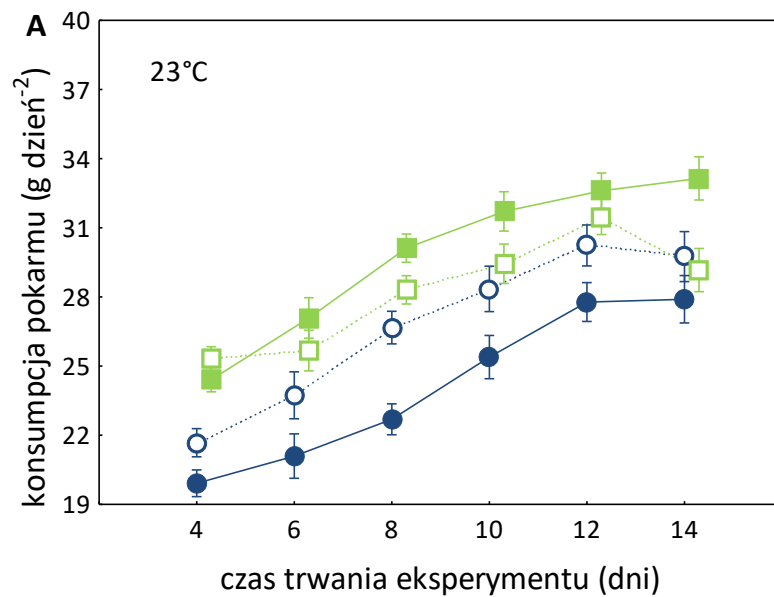


$P = 0,5$
 $r = 0,11$

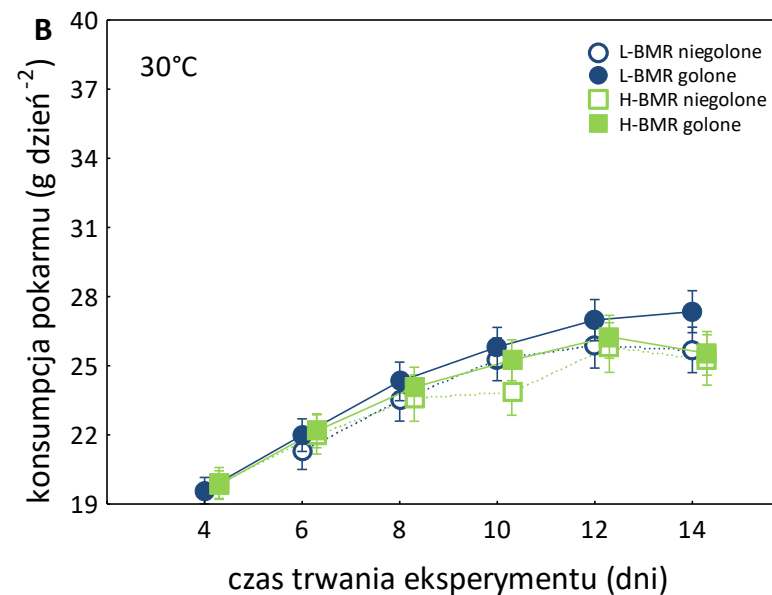


$P < 0,0001$
 $r = 0,54$

Rycina 4. Korelacja między masą miotu a średnią temperaturą ciała obserwowana w 14 dniu laktacji u samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C.

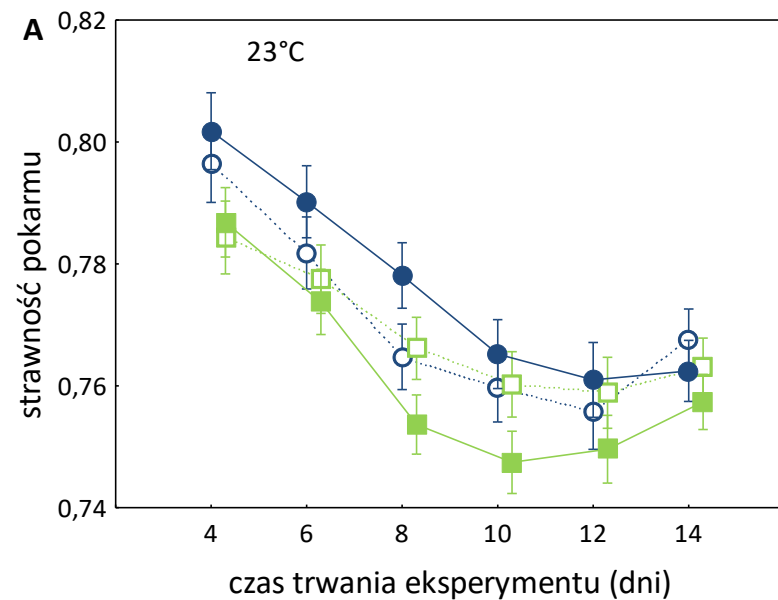


$P_{\text{GOLENIE}} = 0,04$
 $P_{\text{LINIA*GOLENIE}} = 0,001$
 $P_{\text{CZAS}} < 0,0001$

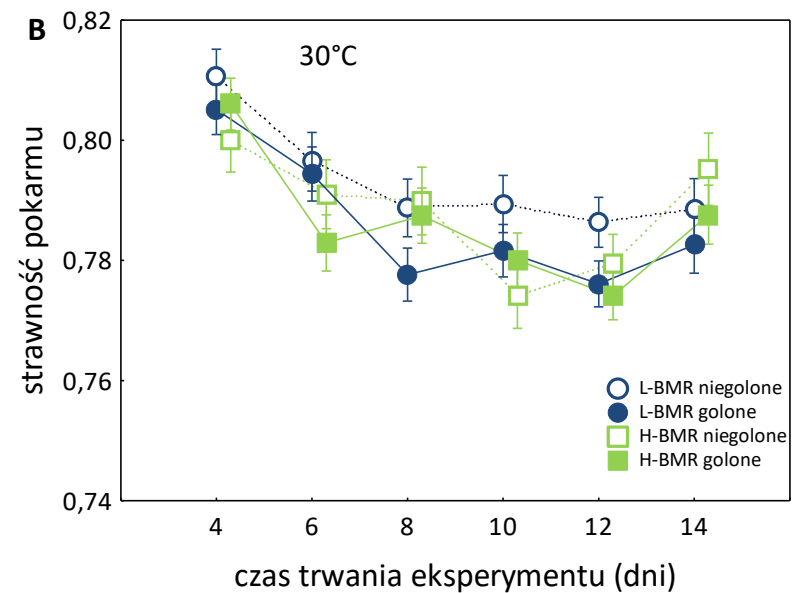


$P_{\text{CZAS}} = 0,002$

Rycina 5. Zmiany w konsumpcji pokarmu laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Części samic z przeciwnych linii selekcyjnych usunięto warstwę izolacyjną (sierść). Konsumpcja pokarmu wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).

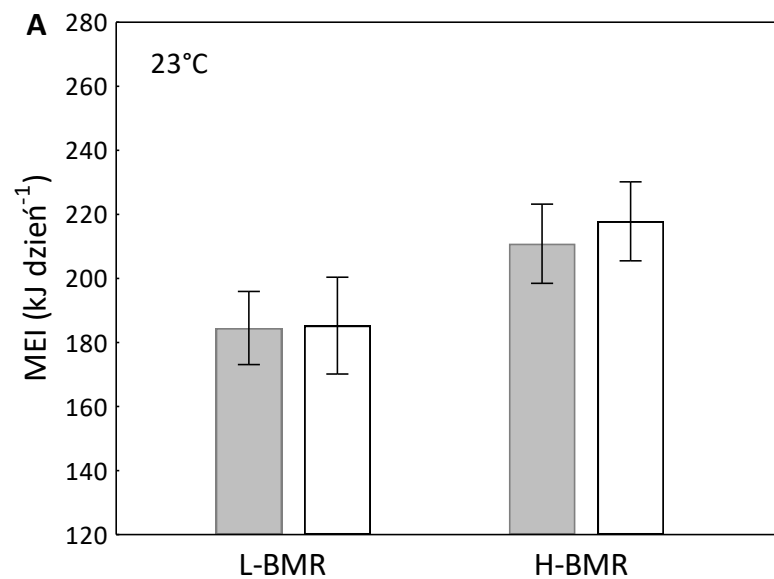


$P_{LINIA} = 0,04$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

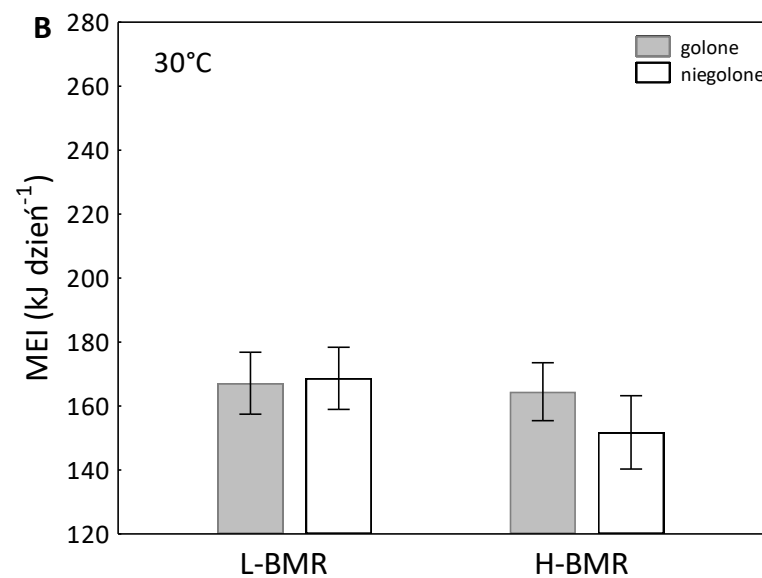


$P_{CZAS} < 0,0001$
 $P_{CZAS * LINIA} = 0,009$

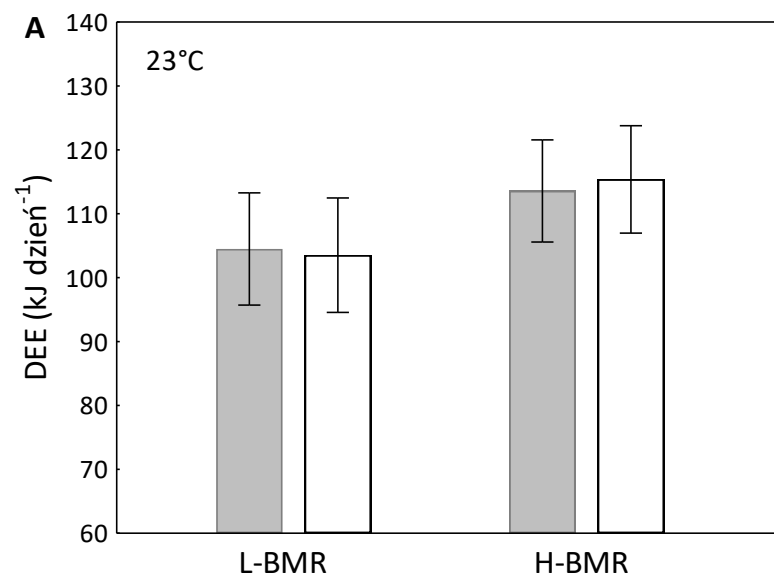
Rycina 6. Zmiany strawności pokarmu u laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Części samic z przeciwnych linii selekcyjnych usunięto warstwę izolacyjną (sierść). Strawność pokarmu wyrażona jest jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.



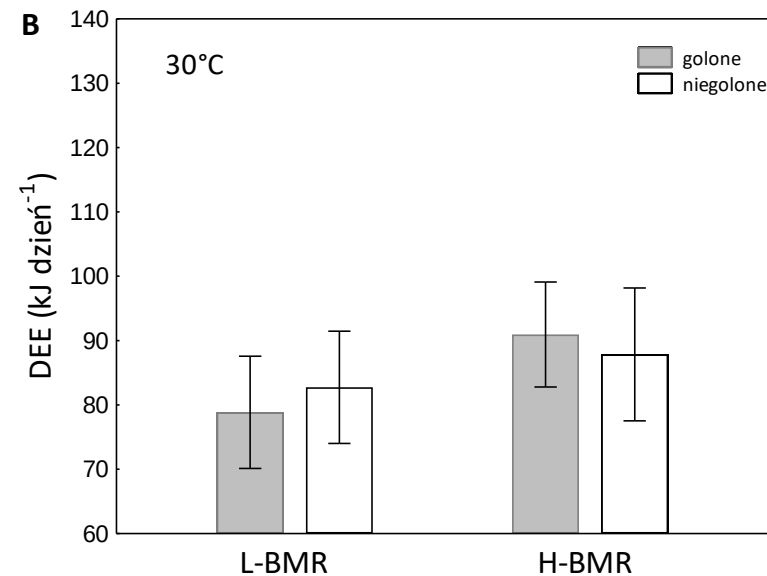
$P_{LINIA} = 0,001$



Rycina 7. Wpływ golenia sierści na ilość energii metabolizowanej (MEI; *Metabolisable Energy Intake*) przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEI oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wartość MEI wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

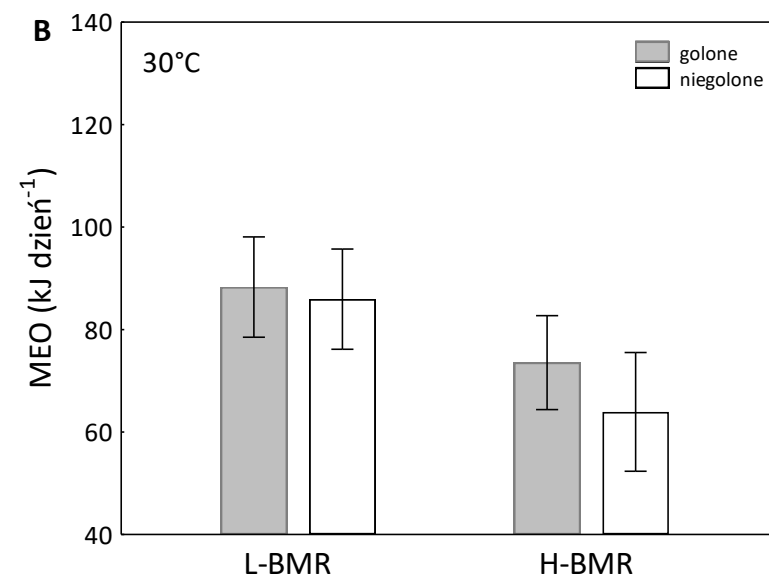
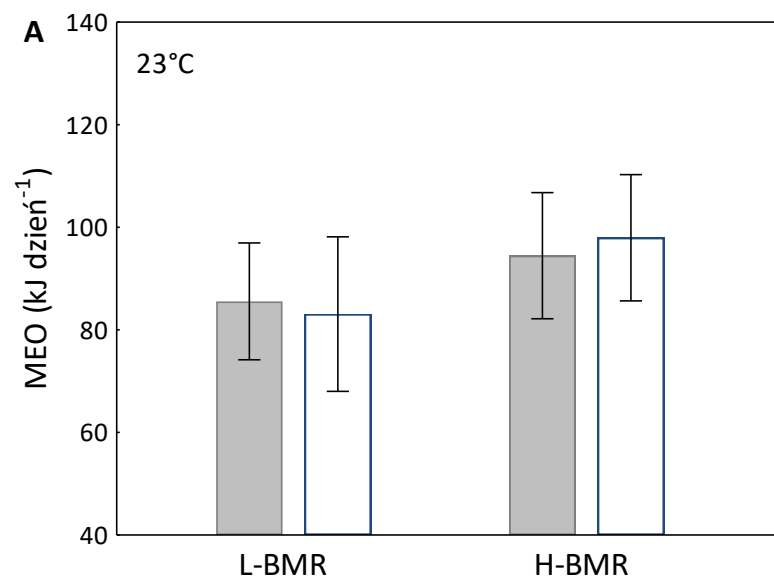


$P_{LINIA} = 0,0003$



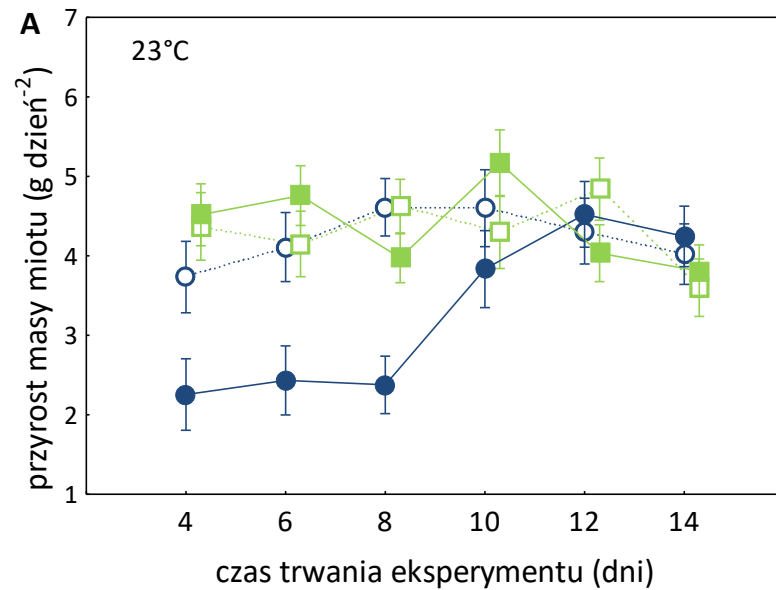
$P_{LINIA} = 0,01$

Rycina 8. Wpływ golenia sierści na codzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*) laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość DEE oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wartość DEE wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

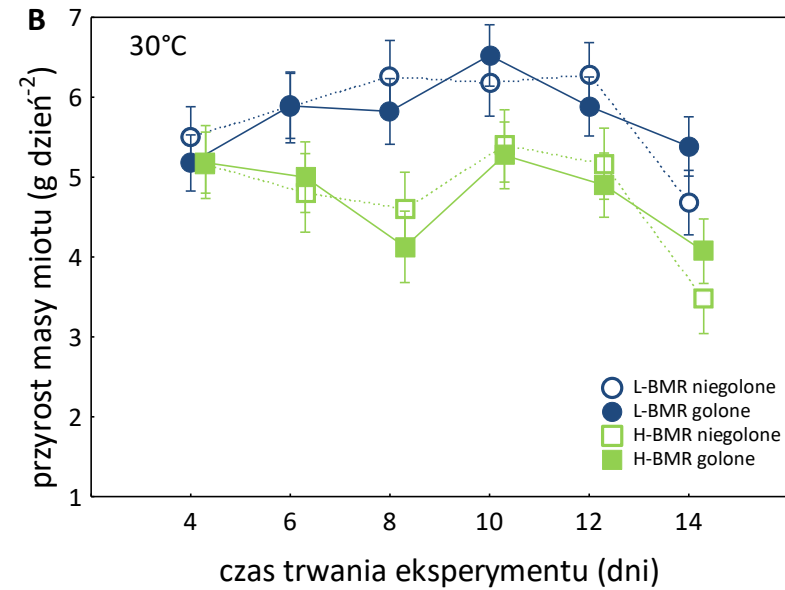


$P_{LINIA} = 0,03$

Rycina 9. Wpływ golenia sierści na kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) produkowanego przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEO oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wartość MEO wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

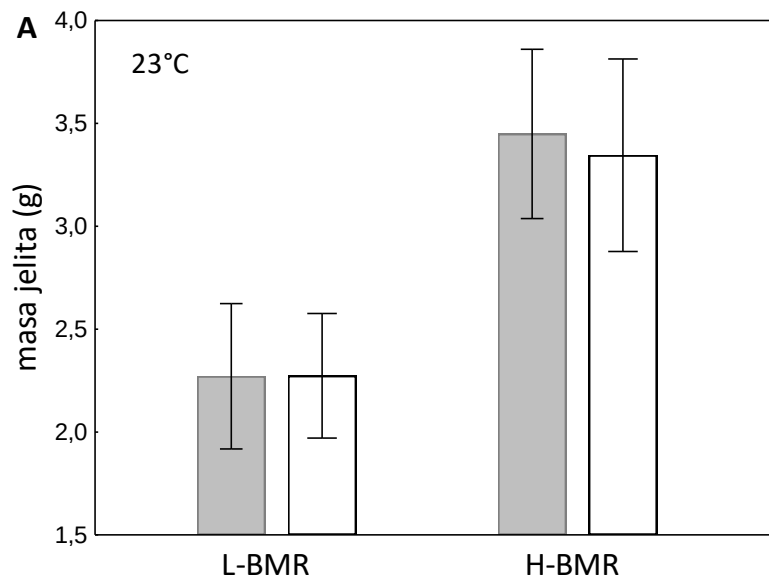


$P_{LINIA * GOLENIE} = 0,04$
 $P_{CZAS} = 0,002$

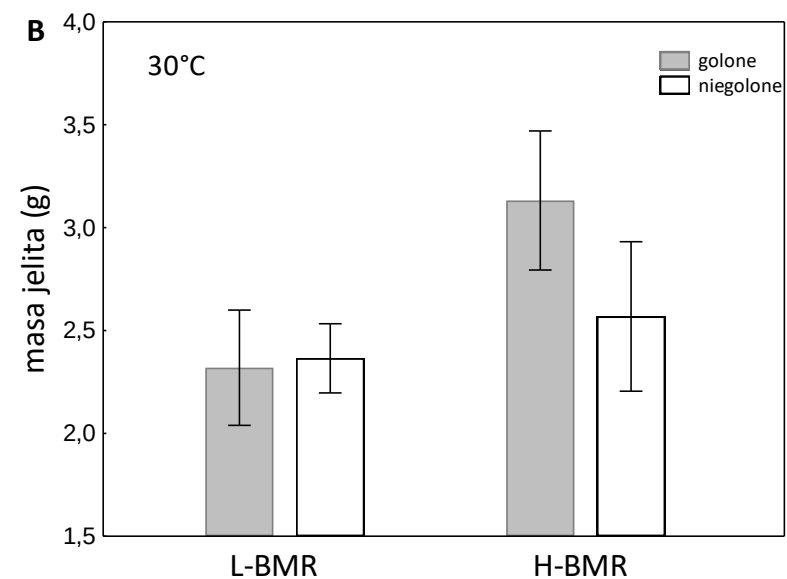


$P_{LINIA} = 0,03$
 $P_{CZAS * GOLENIE} = 0,03$

Rycina 10. Zmiany tempa przyrostu masy miotów laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Części samic z przeciwnych linii selekcyjnych usunięto warstwę izolacyjną (sierść). Przyrost masy miotów wyrażony jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).



$P_{LINIA} < 0,0001$



$P_{LINIA} = 0,0003$

$P_{GOLENIE} = 0,03$

$P_{LINIA * GOLENIE} = 0,01$

Rycina 11. Wpływ golenia sierści na masę jelita cienkiego laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Masa jelita cienkiego wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę jelita.

3. Kompromis między wysiłkiem reprodukcyjnym a reakcją obronną u samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)

Zgodnie z teorią historii życia, ilość energii dostępna organizmowi jest ograniczona. Ograniczenia ilości energii wymuszają realokację pobieranych ze środowiska zasobów między różne, konkurujące ze sobą funkcje fizjologiczne. Okoliczność ta prowadzi do ujawniania się kompromisów fizjologicznych (ang. *trade-off*), polegających na inwestowaniu większej ilości energii w funkcje kluczowe do przeżycia, kosztem redukcji nakładów przeznaczanych na procesy w danym momencie mniej istotne (Stearns 1992).

Jeden z najczęściej opisywanych kompromisów fizjologicznych dotyczy alokacji zasobów energii między reprodukcją a budowaniem odpowiedzi immunologicznej. Jak już zaznaczyłam we Wstępie rozprawy, zarówno wysiłek reprodukcyjny, jak i reakcja odpornościowa są funkcjami wymagającymi dużych nakładów energii. Układ odpornościowy kręgowców jest strukturą niezwykle złożoną, komórki immunokompetentne obecne we krwi i narządach wewnętrznych odpowiadają za rozpoznawanie i usuwanie antygenów. Uruchamianie zarówno nieswoistych, jak i swoistych reakcji obronnych powiązane jest ze zwiększoną konsumpcją tlenu, wymaga zatem dużych zasobów energetycznych. Zapotrzebowanie na energię jest istotne, zwłaszcza w przypadku rozwoju odporności nabytej, kluczowej dla dostosowania organizmu do warunków środowiska (Demas i in. 1997 oraz 2004, Derting i Compton 2003, Klasing 2004, Martin i in. 2008). Okresowi rozrodu towarzyszą natomiast zmiany morfologiczne (m.in. przebudowa narządów wewnętrznych), co związane jest ze zwiększonym zapotrzebowaniem na składniki odżywcze i energię (Johnson i in. 2001b, Speakman 2008, Xu i in. 2012). Ponadto, zarówno reprodukcja, jak i rozwój odpowiedzi immunologicznej generują produkcję dużych ilości metabolicznego ciepła (Lochmiller i Deerenberg 2000, Leshchinsky i Klasing 2001, Martin i in. 2008, Speakman i in. 2008, Yang i in. 2013b).

Ujawnianie się kompromisów między reprodukcją a funkcjonowaniem układu odpornościowego było wielokrotnie obserwowane u zwierząt z różnych grup systematycznych, nie tylko ssaków. Przykładowo, Horn i Luong (2021) wykazali, że kojarzone z samcami samice muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) były bardziej

podatne na infekcje pasożytnicze w porównaniu do samic, które nie brały udziału w reprodukcji. Natomiast samice jednego z gatunków komarów (*Anopheles albimanus*), które poradziły sobie ze zwalczaniem infekcji pasożytniczej, nie były w stanie wyprodukować jaj (Contreras-Gardun i in. 2013). U ptaków, skowronki zwyczajne (*Alauda arvensis*) poddane obciążeniom immunologicznym podczas okresu reprodukcji, obniżały ilość energii inwestowanej w rozród w kolejnym sezonie (Hagemann i in. 2013).

Kompromisy fizjologiczne między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną często badane były u drobnych ssaków. Cai i współautorzy (2009) wykazali, że samce nornika Brandta (*Lasiopodomys brandtii*) w odpowiedzi na immunizację ludzkimi przeciwciałami IgG obniżały masę jąder i najądrzy oraz miały niższy poziom testosteronu w porównaniu do samców nieimmunizowanych. Z kolei chomiki syberyjskie (*Phodopus sungorus*), którym podano substancję ograniczającą wchłanianie glukozy, obniżały ilość energii inwestowanej zarówno w reprodukcję, jak i rozwój reakcji odpornościowej (Carlton i in. 2014).

Jak już zaznaczyłam wcześniej, do niedawna badania nad budżetami energetycznymi zwierząt zakładały, że głównym czynnikiem limitującym wydatkowanie energii jest jej dostępność. Jednak zgodnie z założeniami hipotezy HDL, w celu uniknięcia szkodliwych skutków przegrzania, zwierzęta są ograniczane raczej przez zdolność do skutecznego rozpraszania ciepła metabolicznego (przegląd w Speakman i Król 2010). Zatem, obciążanie budżetów zwierząt dwiema kosztownymi energetycznie funkcjami, związanymi z generowaniem dużych ilości ciepła, powinno przybliżać je do górnej granicy zdolności do rozpraszania ciepła, a w konsekwencji wymusić przyznanie znaczenia priorytetowego funkcji, w danym momencie najważniejszej dla przetrwania. Zarówno reprodukcja, jak i reakcja obronna idealnie wpasowują się w założenia hipotezy HDL, więc ich jednoczesne zastosowanie powinno doprowadzić do ujawniania się kompromisów między tymi funkcjami.

Głównym założeniem Eksperymentu 2 było stworzenie okoliczności do ujawniania się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną u laktujących samic różniących się tempem metabolizmu podstawowego. W tym celu, przeprowadziłam doświadczenie analogiczne do opisanego w Rozdziale 2, różniące się jedynie zastosowaną manipulacją (Rycina 12).

Podobnie, jak w Eksperymentcie 1, w dniu porodu samice z linii L-BMR i H-BMR poddałam ekspozycji do 30°C (tj. temperatury utrudniającej rozpraszanie metabolicznego ciepła). Zamiast usuwania sierści i manipulowania gradientem temperatury między ciałem matek a otoczeniem, obciążyłam budżety energetyczne samic produkcją dodatkowego ciepła, związanego z rozwojem reakcji odpornościowej. W celu wywołania swoistej reakcji obronnej typu humoralnego, immunizowałam samice antygenem KLH (ang. *Keyhole Limpet Hemocyanin*), białkiem izolowanym od ślimaka z gatunku *Megathura crenulata*. Antygen ten warunkuje rozwój zależnej od limfocytów Th2 swoistej reakcji obronnej typu humoralnego. Poza tym, zastosowanie białka KLH idealnie wpasowuje się w założenia Eksperymentu 2, gdyż oprócz tego, że warunkuje powstawanie swoistych przeciwciał anti-KLH IgM, podnosi też wydatki energetyczne zwierząt oraz powoduje produkcję dodatkowego ciepła w postaci gorączki, nie powodując żadnych skutków ubocznych u zwierząt (Demas i in. 1997, Minozzi i in. 2007, Martin i in. 2008, Książek i Konarzewski 2012 oraz 2016, Swaminathan i in. 2017). Z uwagi na fakt, iż maksymalna produkcja przeciwciał anti-KLH IgM obserwowana jest 5 dni po podaniu tego antygenu, poziom odpowiedzi humoralnej oceniłam 14 dnia laktacji (Demas i in. 1997).

Spodziewałam się, że jednoczesne obciążenie budżetów energetycznych zwierząt metabolicznymi kosztami laktacji i rozwoju reakcji obronnej spowoduje produkcję dużych ilości ciepła, przybliży matki do górnej granicy ich zdolności do rozpraszania ciepła i spowoduje ujawnianie się kompromisów między tymi funkcjami. Ujawnianie się kompromisu powinno być silnej manifestowane u matek poddanych ekspozycji do 30°C. Zakładałam, że samice z niskim lub wysokim BMR inaczej odpowiedzą na fizjologiczne ograniczenia spowodowane jednoczesną laktacją i immunizacją. Matki z linii H-BMR (wysokie tempo produkcji energii, wyższa temperatura ciała, silna odpowiedź na antygen KLH i większe inwestycje w opiekę rodzicielską) będą miały trudności w rozpraszaniu ciepła w temperaturze 30°C. By uniknąć hipertermii, ograniczą funkcje obronne organizmu i dadzą priorytet reprodukcji. W efekcie ich młode będą rosły szybciej niż mioty matek z linii L-BMR. Samice z linii L-BMR ponoszą niższe koszty utrzymania organizmu, opieki rodzicielskiej i rozwoju reakcji obronnej. Założyłam, że nawet w temperaturze 30°C ich zdolność do rozpraszania ciepła nie będzie ograniczona w takim samym stopniu, jak u samic z linii H-BMR i nie dojdzie u

nich do immunosupresji. Spodziewałam się, że w 30°C matki z linii o niskim BMR uruchomią produkcję specyficznych przeciwciał anty-KLH IgM, przy czym ich młode osiągną mniejsze rozmiary ciała niż mioty samic z przeciwnej linii selekcyjnej.

3.1. Materiały i metody

3.1.1. Obiekt badań

W Eksperymentcie 2 do rozrodu włączyłam 120 samic myszy laboratoryjnych szczepu Swiss-Webster (po 60 z każdej linii selekcyjnej). Po porodzie matki wychowywały swoje naturalne mioty. Wszystkie samice były w wieku około 18 tygodni i pochodziły z pokolenia F54 sztucznego eksperymentu selekcyjnego prowadzonego w kierunku utrzymania rozbieżnego tempa metabolizmu podstawowego (BMR; Książek i in. 2004, Konarzewski i in. 2005). Opis procedury pomiaru tempa metabolizmu podstawowego, który służy potwierdzeniu przynależności myszy do linii o niskim lub wysokim BMR przedstawiłam w Rozdziale 2 rozprawy (Podrozdział 2.1.1.). Przed rozpoczęciem Eksperymentu 2 (w czasie pomiarów BMR i w okresie ciąży), jak również w jego trakcie, samice przebywały w klimatyzowanych pomieszczeniach o fotoperiodzie 12h/12h (12 godzin dzień/12 godzin noc). Wszystkie samice miały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Zwierzęta karmione były pełnowartościowym granulatem Labofeed produkowanym w Wytwórni Pasz A. Morawski (Kcynia).

3.1.2. Opis eksperymentu

Opisany tutaj Eksperyment 2 przebiegał zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 12. Przed kojarzeniem par w obrębie tej samej linii selekcyjnej, losowo wybranym 40 samicom (20 z linii L-BMR i 20 z linii H-BMR) dootrzewnowo implantowałam transmitters do monitorowania zmian temperatury ciała. W dniu porodu, 30 matek z linii o niskim i tyle samo matek z linii o wysokim BMR wraz z ich miotami przeniosłam z temperatury 23°C do temperatury 30°C. Pozostałe samice i ich młode pozostały w temperaturze kontrolnej 23°C. W 9 dniu laktacji, układ odpornościowy matek stymulowałam do produkcji specyficznych przeciwciał podaniem antygeny KLH (u 15 matek z linii L-BMR i 15 matek z linii H-BMR znajdujących się w temperaturze 23°C oraz u 15 matek z linii L-BMR i 15 matek z linii H-BMR w temperaturze 30°C). Taka sama liczba matek otrzymała zastrzyk w postaci sterylne

PBS (grupa kontrolna do immunizowanej KLH). Od 2 do 14 dnia po porodzie, w odstępach 2-dniowych, kontrolowałam masę i temperaturę ciała matek, konsumpcję pokarmu oraz masę miotów i liczbę młodych w miocie. W szczycie laktacji (między 12 i 14 dniem laktacji; Sadowska i in. 2013) u losowo wybranych samic ze wszystkich grup eksperymentalnych oceniałam parametry związane z asymilacją pokarmu i produkcją energii, takie jak GEI, GE_{feces} , DEI, MEI, DEE oraz MEO. Na cele Eksperymentu 2 stworzyłam 8 grup eksperymentalnych w układzie $2 \times 2 \times 2$ (tzn. linia L-BMR i H-BMR $\times$ temperatura 23°C i 30°C $\times$ KLH i PBS). Wszystkie pomiary wykonałam z wykorzystaniem procedur szczegółowo opisanych w poprzednim Rozdziale (Podrozdział 2.1). W 14-dniu laktacji samice uśmiercałam poprzez dyslokację kręgów szyjnych, pobrałam narządy aktywne metabolicznie (nerki, serce, wątrobę, jelito cienkie, brunatną tkankę tłuszczową) oraz narządy limfatyczne (grasicę, śledzionę i węzły chłonne pachwinowe), które zważyłam z dokładnością do 0,0001 g i zabezpieczyłam w temperaturze -80°C. Pobraną krew odwirowałam przy prędkości 2500 rpm w czasie 15 minut, surowicę zamroziłam w temperaturze -80°C i wykorzystałam do oceny poziomu przeciwciał anty-KLH IgM.

3.1.3. Immunizacja antygenem KLH

Aby indukować rozwój swoistej odpowiedzi humoralnej, podałam samicom podskórnie 150 µg antygeny KLH (Calbiochem, San Diego, CA, USA) rozpuszczonego w 0,1 ml sterylnego płynu fizjologicznego PBS (Książek i Konarzewski 2012 i 2016). Natomiast samice należące do grupy kontrolnej zostały poddane iniekcji taką samą ilością sterylnego PBS w tym samym punkcie czasowym.

3.1.4. Ocena poziomu przeciwciał anty-KLH IgM

Jako miarę natężenia poziomu odpowiedzi immunologicznej przyjąłam poziom przeciwciał anty-KLH IgM w surowicy w 14 dniu laktacji (najwyższy poziom przeciwciał klasy IgM skierowanych przeciwko antygenowi KLH obserwowany jest po upływie 5 dni od immunizacji; Demas i in. 1997). Do oceny stężenia przeciwciał w surowicy wykorzystałam komercyjny test immunoenzymatyczny (KLH IgM Mouse ELISA Kit firmy ABNOVA, numer katalogowy KA2461), który wykonałam zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. W skrócie, 100 µl surowicy pozyskanej od matek (rozcieńczonej

uprzednio w stosunku 1:200) umieściłam w dołkach płytek titracyjnych. Jednocześnie przygotowałam krzywą kalibracyjną, wykorzystując w tym celu dołączone do zestawu standardy. Płytki inkubowałam w temperaturze 25°C przez godzinę, wstrząsając je przy tym delikatnie z prędkością 100 rpm. Po zakończeniu inkubacji zawartość dołków usunęłam, a płytki 5-krotnie wypłukałam używając do tego buforu płuczącego (1 x Wash Solution) w objętości 400 µl na każdy dołek. Następnie, do każdego dołka dodałam po 100 µl Enzyme Conjugate Reagent i inkubowałam płytki przez 45 minut w temperaturze 25°C, wstrząsając je z prędkością 100 rpm. Po tym czasie, zawartość dołków usunęłam i powtórzyłam 5-krotny cykl płukania. Następnie, do każdego dołka dodałam po 100 µl TMB Reagent i ponownie wstrząsałam płytki przy prędkości 100 rpm przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, zatrzymałam przebieg reakcji dodając do każdego dołka po 100 µl Stop Solution. Zawartość dołków wymieszałam i w ciągu 5 minut od zatrzymania reakcji odczytałam gęstość optyczną każdej próby przy długości fali 450 nm, wykorzystując w tym celu czytnik mikropłytek (BioTek, Winooski, VT, USA). Gęstość optyczną każdej próby surowicy czytałam w dwóch powtórzeniach. W oparciu o krzywą kalibracyjną poziom przeciwciał anty-KLH wyraziłam w jednostkach u/ml.

3.1.5. Analiza statystyczna

Międzyliniowe różnice w masie ciała samic przed implantacją transponderów i kojarzeniem w pary oceniłam za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA, gdzie zmienną niezależną była przynależność do linii selekcyjnej (H-BMR lub L-BMR).

Do oceny zmian w masie ciała samic w czasie 14-dniowej laktacji wykorzystałam 3-czynnikową analizę wariancji ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Zmienną zależną była masa ciała matek mierzona w 2-dniowych odstępach (począwszy od 2 do 14 dnia laktacji), zmiennymi niezależnymi były przynależność do linii selekcyjnej (H-BMR lub L-BMR), temperatura otoczenia (23°C lub 30°C) oraz immunizacja (KLH lub PBS).

Zmiany w temperaturze ciała matek oceniłam z wykorzystaniem 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Zmienną zależną była temperatura ciała matek mierzona w 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 dniu po porodzie, natomiast zmiennymi niezależnymi były przynależność do linii selekcyjnej, temperatura

otoczenia oraz immunizacja. Jako zmienną ciągłą w tej analizie zastosowałam masę miotu w kolejnych dniach po porodzie.

Do oceny zmian w konsumpcji, strawności pokarmu oraz tempie przyrostu masy miotów wykorzystałam analizę wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, z tymi samymi trzema zmiennymi niezależnymi, jak wymienione powyżej. Zmienne zależne monitorowane były w 2-dniowych odstępach czasu, od 2 do 14 dnia laktacji. Zmienną ciągłą przy porównaniach konsumpcji pokarmu i tempa przyrostu masy miotów była liczba młodych w miocie w kolejnych dniach laktacji.

Różnice w GEI, GE_{faeces} , DEI, MEI, DEE oraz MEO oceniłam z wykorzystaniem 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA, z przynależnością do linii selekcyjnej, temperaturą otoczenia i immunizacją jako zmiennymi niezależnymi oraz przyrostem masy miotu (między 12 a 14 dniem laktacji) jako zmienną ciągłą.

Masę narządów aktywnych metabolicznie (nerek, jelita cienkiego, serca, wątroby i brunatnej tkanki tłuszczowej) oraz narządów limfatycznych (grasicy, śledziony i węzłów chłonnych pachwinowych) porównywałam z w wykorzystaniem tego samego modelu, z tym że zmienną ciągłą stanowiła masa ciała matek w 14 dniu laktacji, pomniejszona o masę badanego narządu i masę treści jelitowej.

Do porównania różnic w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM wykorzystałam 3-czynnikową analizę wariancji ANOVA ze zmiennymi niezależnymi, jak wyszczególnione powyżej.

Analizę różnic w wyszczególnionych powyżej zmiennych zależnych przeprowadziłam też oddzielnie w obrębie temperatury 23°C i 30°C, z wykorzystaniem 2-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA lub analizy ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, gdzie przynależność do linii selekcyjnej i immunizacja stanowiły zmienne niezależne, a zmienną ciągłą były zmienne wskazane powyżej w odniesieniu do poszczególnych porównań.

Różnice w masie ciała samic (zarówno przed reprodukcją, jak i w czasie trwania laktacji) oraz poziom przeciwciał anty-KLH zostały wyrażone jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Zmiany w temperaturze ciała matek, konsumpcji i strawności pokarmu, tempie przyrostu masy miotów, parametrach GEI, GE_{faeces} , DEI, MEI, DEE i MEO oraz różnice w masie narządów wewnętrznych wyrażone

zostały jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy ANOVA/ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Wyniki wszystkich analiz testowałam na poziomie istotności statystycznej $P = 0,05$. Analizy statystyczne wykonałam przy pomocy programu STATISTICA wersja 13.3.

3.2. Rezultaty

W analizach statystycznych uwzględniłam łącznie 119 samic wraz z ich miotami. Są to wszystkie matki, które wychowywały swoje młode do 14 dnia laktacji. Ostatecznie liczebność grup eksperymentalnych przedstawiała się w następujący sposób:

linia H-BMR, temperatura 23°C, grupa KLH: $n = 14$

linia H-BMR, temperatura 23°C, grupa PBS: $n = 13$

linia H-BMR, temperatura 30°C, grupa KLH: $n = 13$

linia H-BMR, temperatura 30°C, grupa PBS: $n = 14$

linia L-BMR, temperatura 23°C, grupa KLH: $n = 16$

linia L-BMR, temperatura 23°C, grupa PBS: $n = 17$

linia L-BMR, temperatura 30°C, grupa KLH: $n = 17$

linia L-BMR, temperatura 30°C, grupa PBS: $n = 15$.

3.2.1. Różnice w masie ciała matek

Aby porównać masę ciała matek przed rozpoczęciem Eksperymentu 2, wykonałam 1-czynnikową analizę wariancji ANOVA z przynależnością do linii selekcyjnej jako zmienną niezależną. Przed przystąpieniem do reprodukcji, samice nie różniły się masą ciała ($F_{1,118} = 0,96$; $P = 0,3$). Średnia masa ciała ($\pm$ SE) samic reprezentujących linię z wysokim BMR wynosiła 27,70 g ($\pm 0,4$), natomiast samic z linii o niskim BMR wynosiła 27,19 g ($\pm 0,3$).

Masa ciała samic zmieniała się istotnie w czasie trwania laktacji ($P < 0,0001$; Tabela 4). Zmiany masy ciała w czasie eksperymentu nie zależały od przynależności do linii selekcyjnej ($P = 0,9$), temperatury otoczenia ($P = 0,07$), nie zależały też od immunizacji ($P = 0,1$; Tabela 4). Spośród trzech zmiennych niezależnych, istotny wpływ na masę matek miała wyłącznie przynależność linii selekcyjnej. Matki z wysokim BMR były średnio o około 4,1 g cięższe niż ich odpowiedniczki z linii L-BMR ($P < 0,0001$).

Niezależnie od efektu linii selekcyjnej, średnia masa ciała matek była taka sama w obu temperaturach ($P = 0,9$) oraz w grupie matek, którym podano KLH lub PBS ($P = 0,6$). Nie było interakcji między zmiennymi niezależnymi, jak również między czasem trwania eksperymentu a zmiennymi niezależnymi ($P > 0,05$ we wszystkich przypadkach; Tabela 4).

Porównanie masy ciała matek wykonane w obrębie obu temperatur pokazało, że masa ciała matek zmieniała w czasie trwania eksperymentu w obu temperaturach (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,336} = 6,58$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{6,336} = 6,73$; $P < 0,0001$ dla 30°C ; Rycina 13), jednak zmiany masy ciała w czasie były takie same w obu liniach selekcyjnych (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,336} = 0,40$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{6,336} = 0,36$; $P = 0,9$ dla 30°C), jak również w grupie matek immunizowanych i kontrolnych (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,336} = 1,61$; $P = 0,1$ dla 23°C oraz $F_{6,336} = 0,92$; $P = 0,5$ dla 30°C). Zarówno w 23°C i w 30°C , masa ciała matek zależała tylko od przynależności do linii selekcyjnej (Rycina 13). Większą masę ciała miały matki z linii H-BMR w porównaniu do matek z linii L-BMR (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,56} = 14,62$; $P = 0,0003$ dla 23°C oraz $F_{1,56} = 20,29$; $P < 0,0001$ dla 30°C). W obu temperaturach immunizacja nie miała wpływu na masę ciała matek (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,56} = 0,03$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{1,56} = 0,46$; $P < 0,5$ dla 30°C). Interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a immunizacją nie była istotna statystycznie ($P > 0,08$ w obu przypadkach).

3.2.2. Różnice w temperaturze ciała matek

Analiza pokazała, że temperatura ciała matek zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($P = 0,03$; Tabela 4). Zmiany temperatury ciała matek w czasie zależały od temperatury otoczenia i były większe w temperaturze 30°C ($P = 0,007$; Tabela 4). Nieistotne były interakcje między czasem trwania laktacji a przynależnością do linii selekcyjnej oraz czasem trwania laktacji a immunizacją ($P = 0,9$ w obu przypadkach; Tabela 4). Spośród trzech zmiennych niezależnych na temperaturę ciała matek miała wpływ przynależność do linii selekcyjnej (wyższa temperatura ciała u matek z linii H-BMR; $P = 0,0003$; Tabela 4) oraz temperatura otoczenia (wyższa temperatura ciała matek w 30°C ; $P < 0,0001$; Tabela 4). Istotna interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia pokazała, że w 30°C to matki z linii H-BMR miały wyższą temperaturę ciała ($P < 0,0001$; Tabela 4). Immunizacja nie miała wpływu na temperaturę ciała matek ($P =$

0,9), jednak istotna okazała się interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a immunizacją ($P < 0,0001$) oraz między immunizacją a temperaturą otoczenia ($P = 0,0002$; Tabela 4).

Temperatura ciała matek przetrzymywanych w 23°C nie zmieniała się czasie eksperymentu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,90} = 0,67$; $P = 0,7$; Rycina 14A). Nieistotna była też interakcja czas trwania eksperymentu $\times$ linia selekcyjna (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,90} = 0,72$; $P = 0,6$) oraz czas trwania eksperymentu $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,90} = 1,43$; $P = 0,2$). Temperatura ciała matek zależała od immunizacji (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,14} = 14,54$; $P = 0,002$). Najwyższą temperaturę ciała w 23°C miały immunizowane matki z linii L-BMR, co pokazała interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a immunizacją (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,14} = 22,90$; $P = 0,0003$; Rycina 14A). Wpływ przynależności do linii selekcyjnej był na granicy istotności statystycznej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,14} = 4,38$; $P = 0,05$). Analizy wykonane w obrębie temperatury 30°C pokazały, że temperatura ciała samic zmieniała się w czasie (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,84} = 3,61$; $P = 0,003$; Rycina 14B), zmiany te były jednak takie same w obu liniach selekcyjnych (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,84} = 0,80$; $P = 0,6$) oraz w grupie KLH i PBS (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{6,84} = 0,07$; $P = 0,9$). Obie zmienne niezależne miały wpływ na temperaturę ciała matek w 30°C. Wyższą temperaturę ciała miały matki z linii H-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; ; $F_{1,13} = 37,16$; $P < 0,0001$) oraz matki poddane iniekcji roztworem PBS (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,13} = 6,54$; $P = 0,02$; Rycina 14B). Istotna interakcja między tymi dwiema zmiennymi niezależnymi pokazała, że najwyższą temperaturę ciała miały matki z linii H-BMR, którym podałam PBS (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,13} = 5,28$; $P = 0,04$). Analiza wariancji w 30°C wykazała bardzo istotny wpływ masy miotu (zmiennej ciągłej) na temperaturę ciała matek, wykonałam zatem analizę korelacji między masą miotu a temperaturą ciała matek. Analizy potwierdziły istnienie pozytywnej korelacji między tymi cechami ($P < 0,0001$; $r = 0,6$; Rycina 15B). Z rozkładu punktów na rycinie widać, że największą temperaturę ciała miały matki z linii H-BMR, które wychowywały najcięższe mioty. Analogiczna zależność nie była istotna u matek laktujących w temperaturze 23°C ($P = 0,2$; $r = 0,1$; Rycina 15A).

3.2.3. Różnice w konsumpcji pokarmu, strawności i ilości asymilowanej energii

Analiza pokazała, że konsumpcja pokarmu u laktujących samic zmieniała się w czasie trwania eksperymentu ($P < 0,0001$; Tabela 4). Zmiany w ilości spożywanego pokarmu w czasie laktacji większe były w matek w temperaturze 23°C, o czym świadczy istotna interakcja między czasem trwania eksperymentu a temperaturą otoczenia ($P = 0,001$; Tabela 4). Interakcja czas $\times$ linia selekcyjna oraz interakcja czas $\times$ immunizacja nie były istotne ($P > 0,3$ w obu przypadkach; Tabela 4). Spośród zmiennych niezależnych, wpływ na konsumpcję pokarmu okazała się mieć przynależność do linii selekcyjnej ($P < 0,0001$; Tabela 4). Matki z linii H-BMR spożywały więcej pokarmu w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR. Niezależnie od efektu linii selekcyjnej, na ilość konsumowanego pokarmu miała też wpływ temperatura otoczenia ($P < 0,0001$; Tabela 4). Matki umieszczone w 23°C jadły więcej niż te, które poddano ekspozycji do 30°C. Immunizacja nie miała wpływu na ilość konsumowanego pokarmu ($P = 0,7$). Ponadto, żadna z interakcji między zmiennymi niezależnymi nie była istotna statystycznie ($P > 0,3$ we wszystkich przypadkach; Tabela 4).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykonana osobno dla 23°C i 30°C pokazała, że konsumpcja pokarmu zmieniała się w kolejnych dniach laktacji w obu temperaturach ($F_{5,250} = 7,46$; $P < 0,0001$ dla 23°C; $F_{5,245} = 12,32$; $P < 0,0001$ dla 30°C; Rycina 16). W obu temperaturach interakcja czas $\times$ linia selekcyjna oraz czas $\times$ immunizacja okazały się być nieistotne ($P > 0,6$ we wszystkich przypadkach). Zarówno w 23°C, jak i w 30°C, ilość konsumowanego pokarmu była wyższa u matek z linii H-BMR w porównaniu do L-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,50} = 19,12$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{1,49} = 12,28$; $P = 0,001$ dla 30°C; Rycina 16). W obu temperaturach, immunizacja matek nie wpływała na ilość spożywanego pokarmu ($P > 0,3$), nieistotna okazała się także być interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja ($P > 0,3$).

Strawność pokarmu, podobnie jak konsumpcja pokarmu, zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($P < 0,0001$; Tabela 4). Zmiany w strawności pokarmu w czasie laktacji były takie same w obu liniach selekcyjnych (interakcja czas $\times$ linia selekcyjna; $P = 0,6$), w obu temperaturach (interakcja czas $\times$ temperatura otoczenia; $P = 0,5$) oraz w grupie matek KLH i PBS (interakcja czas $\times$ immunizacja; $P = 0,3$; Tabela 4). Spośród zmiennych niezależnych, tylko immunizacja nie miała wpływu na strawność pokarmu ($P = 0,6$). Matki z linii L-BMR lepiej radziły sobie z trawieniem konsumowanego

pokarmu niż samice z linii H-BMR ($P < 0,0001$; Tabela 4), przy czym niezależnie od efektu linii selekcyjnej, pokarm lepiej trawiły matki poddane ekspozycji do 30°C ($P < 0,0001$; Tabela 4). Interakcje między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie ($P > 0,4$ we wszystkich przypadkach; Tabela 4).

Jak pokazała 2-czynnikowa analiza wariancji ANOVA wykonana dla obu temperatur osobno, efektywność trawienia pokarmu zmieniała się w czasie laktacji zarówno w 23°C, jak i w 30°C ($F_{5,260} = 31,77$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{5,250} = 23,64$; $P < 0,0001$ w 30°C; Rycina 17). W obu temperaturach interakcja czas $\times$ linia selekcyjna (2-czynnikowa ANOVA; $F_{5,260} = 1,72$; $P = 0,1$ dla 23°C oraz $F_{5,250} = 0,79$; $P = 0,5$ dla 30°C) oraz interakcja czas $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANOVA; $F_{5,260} = 1,29$; $P = 0,3$ dla 23°C oraz $F_{5,250} = 1,48$; $P = 0,2$ dla 30°C) nie były istotne. Spośród zmiennych niezależnych, tylko przynależność do linii selekcyjnej miała wpływ na strawność pokarmu w obu temperaturach (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,52} = 9,02$; $P = 0,004$ dla 23°C oraz $F_{1,50} = 12,37$; $P = 0,0009$ dla 30°C; Rycina 17). Matki z linii L-BMR lepiej trawiły pokarm zarówno w temperaturze 23°C, jak i 30°C. Immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na strawność pokarmu (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,52} = 0,88$; $P = 0,4$ dla 23°C oraz $F_{1,50} = 0,04$; $P = 0,8$ dla 30°C). Interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie była istotna statystycznie ($P > 0,2$ w obu temperaturach).

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA pokazała, że ekspozycja matek do temperatury 30°C spowodowała redukcję ilości energii brutto pobieranej z pokarmu (GEI; $F_{1,53} = 14,77$; $P = 0,0003$), redukcję ilości energii w odchodach (GE_{feaces} ; $F_{1,52} = 21,53$; $P < 0,0001$), obniżenie dziennego spożycia energii (DEI; $F_{1,53} = 12,50$; $P = 0,0008$) oraz obniżenie ilości energii przyswajanej z pokarmu (MEI; $F_{1,50} = 15,15$; $P = 0,0003$; Tabela 5; Rycina 18). Niezależnie od temperatury otoczenia, wartość GEI, GE_{feaces} , DEI oraz MEI były wyższe u matek z wysokim BMR w porównaniu do matek z linii L-BMR (odpowiednio $F_{1,53} = 11,13$; $P = 0,0003$; $F_{1,52} = 13,84$; $P = 0,0005$; $F_{1,53} = 9,15$; $P = 0,004$; $F_{1,50} = 7,03$; $P = 0,01$; Tabela 5). Immunizacja nie miała wpływu na wartość żadnego z badanych parametrów ($P > 0,3$ we wszystkich przypadkach). Interakcje między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie ($P < 0,2$ we wszystkich przypadkach).

Z uwagi na silny efekt temperatury otoczenia w modelu głównym, wykonałam też 2-czynnikową analizę wariancji ANCOVA oddzielnie dla temperatury 23°C i 30°C.

Wartość GEI oraz GE_{feaces} była wyższa u matek z linii H-BMR zarówno w temperaturze 23°C, jak i 30°C (GEI ; $F_{1,24} = 5,36$; $P = 0,03$ dla 23°C i $F_{1,27} = 4,46$; $P = 0,04$ dla 30°C oraz GE_{feaces} ; $F_{1,23} = 5,71$; $P = 0,03$ dla 23°C oraz $F_{1,27} = 7,66$; $P = 0,01$ dla 30°C). Wartość DEI również była wyższa u matek z wysokim BMR, jednak efekt przynależności do linii selekcyjnej istotny był wyłącznie w 23°C ($F_{1,24} = 4,54$; $P = 0,04$ dla 23°C oraz $F_{1,27} = 3,39$; $P = 0,1$ dla 30°C). Z kolei wartość MEI nie różniła się między matkami z przeciwnych linii selekcyjnych w obu temperaturach ($F_{1,23} = 3,73$; $P = 0,07$ dla 23°C oraz $F_{1,25} = 2,81$; $P = 0,1$ dla 30°C; Rycina 18). Immunizacja nie miała wpływu na wartość GEI, GE_{feaces} , DEI oraz MEI w obu temperaturach ($P > 0,4$ we wszystkich przypadkach), podobnie jak brak interakcji linia selekcyjna $\times$ immunizacja ($P > 0,5$ we wszystkich przypadkach).

3.2.4. Różnice w dziennych wydatkach energetycznych i ilości energii w mleku

Dzienne wydatki energetyczne (DEE) matek zależały od przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,50} = 19,41$; $P < 0,0001$). Wydatki energetyczne matek z linii H-BMR były wyższe w porównaniu do matek z linii L-BMR (Tabela 5). Niezależnie od przynależności do linii selekcyjnej, matki laktujące w 23°C miały wyższe dzienne wydatki energetyczne w porównaniu do samic umieszczonych w 30°C ($F_{1,50} = 19,48$; $P < 0,0001$, Tabela 5; Rycina 19). Immunizacja nie miała wpływu na DEE matek ($F_{1,50} = 3,20$; $P = 0,08$). Interakcje między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie ($P > 0,07$ we wszystkich przypadkach).

Jak pokazała 2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA, poziom DEE matek zależał od przynależności do linii selekcyjnej zarówno w 23°C, jak i 30°C ($F_{1,23} = 14,39$; $P = 0,0009$ dla 23°C oraz $F_{1,25} = 4,08$; $P = 0,05$ dla 30°C; Rycina 19). Immunizacja nie miała wpływu na DEE matek laktujących w obu temperaturach otoczenia ($F_{1,23} = 1,12$; $P = 0,3$ dla 23°C oraz $F_{1,25} = 1,71$; $P = 0,2$ dla 30°C). Interakcje między przynależnością do linii selekcyjnej a immunizacją były nieistotne statystycznie ($P > 0,2$ w obu temperaturach).

Ilość energii w mleku matek nie zależała od przynależności do linii selekcyjnej (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,50} = 0,001$; $P = 0,9$; Tabela 5), jak również od immunizacji antygenem KLH (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,50} = 0,00$; $P = 0,9$; Tabela 5). Matki poddane ekspozycji do 30°C i matki przetrzymywane w temperaturze kontrolnej miały taką samą wartość MEO (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,50} = 2,75$; $P = 0,1$; Tabela 5). Interakcje

między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA ujawniła brak efektu przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,23} = 0,59$; $P = 0,4$ dla 23°C oraz $F_{1,25} = 0,42$; $P = 0,5$ dla 30°C) i brak wpływu immunizacji antygenem KLH ($F_{1,23} = 0,03$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{1,25} = 0,03$; $P = 0,9$ dla 30°C) na MEO matek w obu temperaturach (Rycina 20). Interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja także nie była istotna statystycznie ($P > 0,2$).

3.2.5. Różnice w tempie przyrostu masy miotów

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA ujawniła, że tempo przyrostu masy miotów nie zmieniało się w czasie trwania eksperymentu ($P = 0,1$; Tabela 4). Istotna statystycznie okazała się być interakcja między czasem trwania eksperymentu a linią selekcyjną sugerująca, że zmiany masy miotów w czasie były większe u matek z linii H-BMR ($P = 0,01$). Interakcja czas $\times$ temperatura otoczenia ($P = 0,4$) oraz interakcja czas $\times$ immunizacja ($P = 0,9$) były nieistotne statystycznie. Spośród trzech zmiennych niezależnych, istotny wpływ na przyrost masy miotów miała temperatura otoczenia oraz przynależność do linii selekcyjnej. Szybciej przyrastały mioty matek poddanych ekspozycji do temperatury 30°C ($P < 0,0001$; Tabela 4). W tej temperaturze średni przyrost masy miotu między dwoma kolejnymi dniami laktacji wynosił $5,54 \text{ g} \pm 0,11$, natomiast w temperaturze 23°C przyrost był równy $4,54 \text{ g} \pm 0,11$. Niezależnie od efektu temperatury otoczenia, mioty matek z linii H-BMR przyrastały szybciej w porównaniu do miotów matek z linii L-BMR ($P < 0,0001$; Tabela 4). Immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na tempo przyrostu masy miotów ($P = 0,9$; Tabela 4). Istotna interakcja temperatura otoczenia $\times$ immunizacja ujawniła, że najwolniej przyrastały mioty matek nieimmunizowanych w temperaturze 23°C ($P = 0,01$; Tabela 4).

Analizy wykonane w obrębie temperatury 23°C nie potwierdziły zmian w przyroście masy miotów w czasie (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,235} = 0,14$; $P = 0,9$; Rycina 21A). Nieistotna okazała się interakcja czas $\times$ przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,235} = 1,85$; $P = 0,1$) oraz interakcja czas $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,235} = 0,47$; $P = 0,8$). Z kolei w 30°C zaobserwowałam istotne zmiany w tempie przyrostu masy miotów w kolejnych dniach laktacji (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,230} = 6,20$; $P < 0,0001$; Rycina 21B). Interakcja czas $\times$ przynależność do linii

selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,230} = 1,61$; $P = 0,2$), jak również interakcja czas $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,230} = 0,72$; $P = 0,6$) nie były istotne. Zarówno w temperaturze 23°C, jak i 30°C, przyrost masy miotu zależał od przynależności do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,47} = 14,52$; $P = 0,0004$ dla 23°C oraz $F_{1,46} = 8,18$; $P = 0,006$ dla 30°C; Rycina 21). W obu temperaturach mioty wychowywane przez matki z linii H-BMR były cięższe w porównaniu do miotów matek z linii L-BMR. Niezależnie od efektu linii selekcyjnej, immunizacja antygenem KLH (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,47} = 3,42$; $P = 0,07$ dla 23°C oraz $F_{1,46} = 3,93$; $P = 0,06$ dla 30°C), podobnie jak interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,47} = 0,64$; $P = 0,4$ dla 23°C oraz $F_{1,46} = 0,12$; $P = 0,7$ dla 30°C) nie osiągnęły progu istotności statystycznej.

3.2.6. Różnice w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM

Samice z linii H-BMR wyprodukowały nieznacznie więcej przeciwciał anty-KLH IgM w porównaniu do matek z niskim BMR (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,75} = 3,66$; $P = 0,05$; Tabela 5). Na poziom przeciwciał nie miała wpływu temperatura otoczenia (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,75} = 0,05$; $P = 0,8$; Tabela 5). Matki z grupy KLH i PBS nie różniły się poziomem przeciwciał anty-KLH (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,75} = 0,0001$; $P = 0,9$; Tabela 5). Żadna z interakcji między zmiennymi niezależnymi nie była istotna statystycznie ($P > 0,2$ we wszystkich przypadkach).

Po wykonaniu analiz osobno w obu temperaturach otoczenia okazało się, że w 23°C nadal utrzymywał się efekt przynależności do linii selekcyjnej obserwowany w modelu głównym (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,38} = 3,81$; $P = 0,05$; Rycina 22A). Natomiast w 30°C, przynależność do linii selekcyjnej nie wpływała na poziom przeciwciał anty-KLH IgM (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,37} = 0,58$; $P = 0,5$; Rycina 22B). W obu temperaturach, efekt immunizacji nie był istotny statystycznie (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,38} = 0,58$; $P = 0,4$ dla 23°C oraz $F_{1,37} = 0,58$; $P = 0,4$ dla 30°C), interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,38} = 0,11$; $P = 0,7$ dla 23°C oraz $F_{1,37} = 0,002$; $P = 0,9$ dla 30°C).

3.2.7. Różnice w masie narządów wewnętrznych

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykazała istotny wpływ przynależności do linii selekcyjnej na masę badanych narządów wewnętrznych (Tabela 6). Z wyjątkiem masy

brunatnej tkanki tłuszczowej (która była większa u matek z linii L-BMR; $F_{1,110} = 50,89$; $P < 0,0001$), masa pozostałych narządów była większa u samic z wysokim BMR (nerki: $F_{1,110} = 109,16$; $P < 0,0001$; jelito cienkie: $F_{1,111} = 24,49$; $P < 0,0001$; serce: $F_{1,111} = 11,56$; $P = 0,0009$; wątroba: $F_{1,111} = 11,45$; $P = 0,0009$; grasica: $F_{1,105} = 10,29$; $P = 0,002$; śledziona: $F_{1,110} = 61,93$; $P < 0,0001$ oraz węzły chłonne pachwinowe: $F_{1,107} = 14,05$; $P = 0,0002$; Tabela 6). Niezależnie od efektu przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycja do 30°C spowodowała spadek masy nerek ($F_{1,110} = 15,25$; $P < 0,0001$) i wątroby ($F_{1,111} = 9,83$; $P = 0,002$), ale przyrost masy grasicy w porównaniu do temperatury 23°C ($F_{1,105} = 7,42$; $P = 0,007$; Rycina 23B). W przypadku masy śledziony zaobserwowałam istotną interakcję między przynależnością do linii selekcyjnej a temperaturą otoczenia, przy czym największe śledziony miały matki z linii H-BMR laktujące w 23°C ($F_{1,110} = 6,70$; $P = 0,01$, Rycina 24). Immunizacja antygenem KLH miała wpływ jedynie na masę węzłów chłonnych ($F_{1,107} = 5,89$; $P = 0,02$; Tabela 6). Istotna interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja ujawniła, że masa węzłów chłonnych większa była u immunizowanych matek z linii H-BMR ($F_{1,107} = 6,12$; $P = 0,01$; Rycina 25).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykonana dla temperatury 23°C potwierdziła wpływ przynależności do linii selekcyjnej na masę brunatnej tkanki tłuszczowej ($F_{1,54} = 15,80$; $P = 0,0002$), masę jelita cienkiego ($F_{1,55} = 18,38$; $P < 0,0001$); masę nerek ($F_{1,55} = 53,41$; $P < 0,0001$), masę serca ($F_{1,55} = 8,54$; $P = 0,005$); masę śledziony ($F_{1,54} = 38,00$; $P < 0,0001$; Rycina 24A); masę wątroby ($F_{1,55} = 4,82$; $P = 0,03$) oraz masę węzłów chłonnych ($F_{1,54} = 14,68$; $P = 0,0003$; Rycina 25A). Masa brunatnej tkanki tłuszczowej większa była w linii L-BMR, matki z linii H-BMR miały większą masę pozostałych narządów. Matki z przeciwnych linii selekcyjnych nie różniły się masą grasicy w 23°C ($F_{1,55} = 3,46$; $P = 0,06$; Rycina 23A). Immunizacja antygenem KLH, ani interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach). W temperaturze 30°C, matki z linii H-BMR miały większą masę jelita cienkiego ($F_{1,54} = 8,94$; $P = 0,004$), nerek ($F_{1,53} = 61,06$; $P < 0,0001$), śledziony ($F_{1,54} = 26,21$; $P < 0,0001$; Rycina 24B), wątroby ($F_{1,54} = 7,77$; $P = 0,007$) i grasicy ($F_{1,48} = 7,81$; $P = 0,007$; Rycina 23B), ale mniejszą masę brunatnej tkanki tłuszczowej ($F_{1,54} = 37,69$; $P < 0,0001$) w porównaniu do matek z linii L-BMR. Masa serca ($F_{1,54} = 3,09$; $P = 0,08$) i węzłów chłonnych ($F_{1,51} = 1,72$; $P = 0,2$; Rycina 25B) nie różniła się między liniami selekcyjnymi w tej temperaturze. W przypadku węzłów

chłonnych, nadal utrzymywała się istotna interakcja między przynależnością do linii selekcyjnej a immunizacją. W 30°C większe węzły chłonne miały matki z linii H-BMR, poddane immunizacji antygenem KLH ($F_{1,51} = 5,41$; $P = 0,02$; Rycina 25B).

3.3. Dyskusja

Zebrane wyniki pokazały, że decyzje o przyznaniu priorytetu inwestycjom w rozród lub reakcję obronną matki z przeciwnych linii selekcyjnych podejmowały w odmienny sposób. W temperaturze 23°C, matki z linii H-BMR utrzymywały większą masę ciała niż samice z niskim BMR (Rycina 13A). W przypadku obu linii selekcyjnych, immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na zmiany masy ciała w czasie laktacji. Matki z linii H-BMR konsumowały więcej pokarmu od ich odpowiedniczek z linii L-BMR, jednak ilość spożywanego pokarmu była taka sama u matek poddanych immunizacji i nieimmunizowanych (Rycina 16A). Z kolei matki z niskim BMR trawiły pokarm efektywniej niż ich odpowiedniczki z wysokim tempem metabolizmu (zarówno immunizowane oraz kontrolne; Rycina 17A). Większe spożycie pokarmu przez matki z linii H-BMR w szczycie laktacji (między 12 a 14 dniem) nie wiązało się z asymilowaniem większej ilości energii z pokarmu w tym samym okresie (Rycina 16A i 18A), przy czym codzienne wydatki energetyczne matek z tej linii były wyższe (ale takie same u matek immunizowanych i kontrolnych; Rycina 19A). Przyrost masy miotów samic z linii H-BMR w temperaturze 23°C był szybszy niż miotów wychowywanych przez matki z niskim BMR, mimo braku międzyliniowych różnic w kaloryczności mleka matek (Rycina 20A i 21A). Jak pokazuje Rycina 21A, między 12 a 14 dniem laktacji przyrost masy miotów był wolniejszy niż w dniach poprzednich, przy czym trend ten był taki sam u matek z przeciwnych linii selekcyjnych. W 14 dniu laktacji, samice z wysokim BMR wyprodukowały nieznacznie więcej przeciwciał anti-KLH IgM niż samice z linii L-BMR, wynik ten był na granicy istotności statystycznej (Rycina 22A).

Matki z przeciwnych linii selekcyjnych eksponowane do 30°C nie różniły się masą ciała w porównaniu do matek w temperaturze kontrolnej (Tabela 4), jednak w 30°C większą masę ciała miały matki z linii H-BMR (Rycina 13B). Ilość pobieranego przez matki pokarmu była niższa w 30°C niż w warunkach kontrolnych, przy czym podobnie, jak w 23°C, więcej pokarmu konsumowały matki z wysokim BMR (Rycina 16B). Matki poddane ekspozycji do temperatury 30°C lepiej radziły sobie z trawieniem pokarmu,

lepszą efektywność trawienia wykazywały jednak matki z linii L-BMR (Rycina 17B). Większe spożycie pokarmu przez matki z linii H-BMR w szczycie laktacji (między 12 a 14 dniem; Rycina 16B) także nie korespondowało z asymilowaniem większej ilości energii z pokarmu w tym samym okresie (Rycina 18B). Podobnie, jak w temperaturze 23°C, w 30°C tylko dzienne wydatki energetyczne zależały od przynależności do linii selekcyjnej i były nieco większe u matek z linii H-BMR (Rycina 19B). Analogicznie, jak w temperaturze 23°C, wolniejszymu w porównaniu do wcześniejszych dni laktacji przyrostowi masy miotów między 12 a 14 dniem laktacji, nie towarzyszyły międzyliniowe różnice w kaloryczności mleka (Rycina 20B i 21B). Odwrotnie niż w kolejnych dniach laktacji, w jej szczytowym punkcie (między 12 a 14 dniem) szybciej przyrastały mioty matek z linii L-BMR w porównaniu do miotów matek z wysokim BMR ($F_{1,46} = 7,69$; $P = 0,007$). Poziom specyficznych przeciwciał anty-KLH IgM także był taki sam u matek z przeciwnych linii selekcyjnych (Rycina 22B).

Immunizacja matek wychowujących potomstwo w temperaturze 23°C skutkowała wzrostem temperatury ciała, przy czym najwyższą temperaturę ciała miały matki z linii L-BMR immunizowane antygenem KLH (interakcja linia selekcyjna x immunizacja; Rycina 14A). Nie można tej obserwacji wiązać z kosztami rozwoju odpowiedzi immunologicznej, ponieważ antygen KLH podany był w 9 dniu laktacji a podwyższona temperatura ciała u matek z tej linii utrzymywała się od 4 dnia laktacji. Z kolei w 30°C, najwyższą temperaturę ciała zaobserwowałam u matek z linii H-BMR, które zostały poddane iniekcji roztworem PBS (interakcja linia selekcyjna x immunizacja; Rycina 14B). Obserwacja ta może wiązać się z tym, że w tej temperaturze przyrost masy miotów był największy właśnie u matek z linii H-BMR (zarówno immunizowanych, jak i z grupy kontrolnej; Rycina 21B), nie uruchomiły one też produkcji przeciwciał (nie było różnic w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM w 14 dniu laktacji; Rycina 22B). Ponadto, w 30°C istniała pozytywna korelacja między masą wychowywanego przez matki miotu a ich temperaturą ciała (Rycina 15B). Rozkład punktów wskazuje, że efekt ten dotyczył głównie samic z wysokim BMR. Wynik ten koresponduje z obserwacją, że zarówno immunizowane, jak i kontrolne matki z linii H-BMR, wychowywały największe mioty w 30°C, potwierdzając tym samym wyniki wcześniejszych prac, mówiące o tym, że u matek wychowujących duże potomstwo, wzrost temperatury ciała świadczy o akumulacji ciepła uwalnianego podczas

intensywnej produkcji energii na potrzeby reprodukcji (Zhao i in. 2016, Wen i in. 2017, Deng i in. 2020).

Ekspozycja samic do wysokiej temperatury otoczenia skutkowała zwiększeniem masy grasicy, przy czym większą masę grasicy miały matki z linii H-BMR (Rycina 23B). Ponadto, w 30°C zaobserwowałam wzrost masy węzłów chłonnych wyłącznie w grupie immunizowanych matek z wysokim BMR (interakcja linia selekcyjna x immunizacja; Rycina 25B). Natomiast samice z wysokim BMR laktujące w 23°C miały śledziony o największej masie (Rycina 24A). Zaobserwowany schemat powiększenia centralnych i obwodowych narządów limfatycznych w obu temperaturach otoczenia może wskazywać na zwiększoną proliferację immunokompetentnych komórek obecnych nie tylko w krwi obwodowej, ale także w narządach limfatycznych. Immunizacja antygenem KLH generuje rozwój swoistej odpowiedzi typu humoralnego, produkcja przeciwciał anty-KLH klasy IgM jest zależna od limfocytów Th2, które ulegają końcowym etapom różnicowania i dojrzewania w grasicy. Nie można zatem wykluczyć, że powiększona masa grasicy u matek z linii H-BMR, laktujących w 30°C jest powiązana z intensyfikacją dojrzewania limfocytów T (przed opuszczeniem grasicy), jak również napływem prekursorów limfocytów T (tzw. tymocytów) ze szpiku kostnego. Po zakończeniu procesu różnicowania w grasicy, w pełni dojrzałe limfocyty T oraz powstałe w szpiku kostnym limfocyty B przemieszczają się do krwiobiegu oraz obwodowych narządów limfatycznych (między innymi śledziony i węzłów chłonnych), gdzie po kontakcie z antygenem różnicują się w komórki efektorowe (Demas i in. 1997, Roitt i in. 1998, Gołąb i in. 2004, Gui i in. 2007, Minozzi i in. 2007, Martin i in. 2008, Chinn i in. 2012, Książek i Konarzewski 2012, Robinson i in. 2016, Swaminathan i in. 2017, Thapa i Farber 2019, Horst i in. 2021). Powiększona masa śledziony u matek z linii H-BMR w 23°C może świadczyć o dużym zagęszczeniu komórek immunokompetentnych, niezbędnych do budowania odporności (Rycina 24A). Wynik ten koresponduje z nieco większym poziomem przeciwciał, wyprodukowanym przez matki z tej linii w porównaniu do samic z niskim BMR (Rycina 22A). Powiększenie masy węzłów chłonnych u samic z linii H-BMR, obserwowane po immunizacji antygenem w wysokiej temperaturze otoczenia (Rycina 25B), także może wskazywać na zwiększoną koncentrację antygeny wnikającego do organizmu oraz wynikające z tego większe zagęszczenie komórek immunokompetentnych. Poziom przeciwciał anty-KLH IgM w

30°C u matek z linii H-BMR nie był wyższy, w porównaniu do różnic obserwowanych w temperaturze 23°C (Rycina 22B), zatem powiększenie węzłów chłonnych po immunizacji może sugerować, że matki z tej linii dopiero rozpoczynały budować reakcję obronną. Przypuszczenie o rozpoczynaniu budowania kompromisów przez matki z linii H-BMR w ostatnim dniu laktacji wzmacnia obserwowany w tych warunkach wzrost masy grasicy oraz obniżenie tempa przyrostu masy miotów w szczycie laktacji. W okresie między 12 a 14 dniem laktacji, mioty matek z linii H-BMR przyrastały o około 0,6 g wolniej niż mioty matek z linii L-BMR. Nie można zatem wykluczyć, że matki z wysokim BMR dały priorytet reprodukcji, jednak w momencie gdy potomstwo nie było zależne wyłącznie od opieki rodzicielskiej, rozpoczęły budowanie reakcji obronnej. Ocena poziomu przeciwciał w Eksperymentie 2 wykonana była jedynie piątego dnia po immunizacji (tj. w ostatnim dniu laktacji), co utrudnia określenie punktu czasowego w którym produkcja przeciwciał byłaby najwyższa.

Eksperyment testujący ujawnianie się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną u myszokoczków mongolskich (*Meriones unguiculatus*) laktujących w trzech temperaturach otoczenia (10°C, 21°C oraz 30°C) wykazał szybszy przyrost masy miotu w 21°C w porównaniu do 30°C. Nie zaobserwowano natomiast różnic w poziomie przeciwciał anty-PHA po immunizacji swoistym antygenem, ani zmian w masach narządów limfatycznych u zwierząt poddanych ekspozycji do różnych temperatur otoczenia. Myszokoczki laktujące w 30°C miały najwyższy całkowity poziom przeciwciał klasy IgG (Yang i in. 2013b). Z kolei Xu i współautorzy (2012) wykazali brak istotnych różnic w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM i IgG u norników Brandta, wychowujących mioty o naturalnych i powiększonych rozmiarach. Laktujące samice miały wyższy poziom przeciwciał anty-KLH IgG po immunizacji antygenem, w porównaniu do samic niereprodukcyjnych, co wskazuje na brak tłumienia funkcji obronnych w odpowiedzi na wysokie zapotrzebowanie na energię w okresie laktacji. Co ważne, w obu przytoczonych pracach, w których testowano kompromisy między reprodukcją a odpowiedzią immunologiczną u gryzoni, obserwowano wzrost poziomu wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej typu nieswoistego (m.in. całkowite stężenie przeciwciał naturalnych klasy IgG). Nie można zatem wykluczyć, że w związku z obciążeniami energetycznymi spowodowanymi laktacją, zwierzęta w momencie infekcji, uruchamiają przede wszystkim wrodzone mechanizmy obronne,

które są mniej wyspecjalizowane i wymagają mniejszych nakładów energetycznych (Xu i in. 2012, Yang i in. 2013).

Podsumowując, zebrane w Eksperymentcie 2 wyniki pokazały, że odpowiedź na jednoczesne obciążenie budżetów energetycznych zwierząt kosztami reprodukcji i reakcji immunologicznej jest zależna zarówno od indywidualnego tempa metabolizmu podstawowego, jak i temperatury otoczenia. Przeciwnie do moich założeń, w temperaturze 30°C (ale także w warunkach kontrolnych) laktujące samice z niskim BMR dały priorytet wyłącznie reprodukcji, przesuwając budowanie odpowiedzi immunologicznej na czas usamodzielnienia się potomstwa. Natomiast u matek z wysokim BMR zauważyłam reakcje, które mogą prowadzić do ujawniania się kompromisów między obiema badanymi funkcjami. W temperaturze 23°C mioty matek z linii H-BMR przyrastały szybciej w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR, jednak w ostatnim dniu laktacji, gdy tempo przyrostu masy miotu spadło, matki z tej linii rozpoczęły produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi KLH. W temperaturze 30°C, z początkiem laktacji matki z wysokim BMR także inwestowały energię w wychowanie potomstwa, jednak obserwowany w ostatnich dniach laktacji wzrost masy narządów limfatycznych oraz spadek tempa przyrostu masy miotu wskazują na początek budowania kompromisów między reprodukcją a odpowiedzią immunologiczną. Zebrane dane potwierdzają moje przewidywania o ujawnianiu się kompromisów energetycznych, jednak inaczej niż zakładałam, wskazują na to, że to matkom z wysokim tempem metabolizmu łatwiej było łączyć dwie energetycznie kosztowne funkcje fizjologiczne. Ponadto, ujawnianie się kompromisów było silniej manifestowane w temperaturze 23°C, a nie jak zakładałam w 30°C, co może wskazywać na większe obciążenie trudnościami w rozpraszaniu ciepła matek nieogolonych w wysokiej temperaturze otoczenia.

3.4. Tabele i ryciny

Tabela 4. Wyniki 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów w powtórzonych pomiarach z przynależnością do linii selekcyjnej, ekspozycją do temperatury 30°C i immunizacją antygenem KLH jako zmiennymi niezależnymi oraz wpływem czasu trwania eksperymentu na zmiany masy ciała, temperatury ciała, konsumpcji i strawności pokarmu oraz tempa przyrostu masy miotów u niepozbawionych sierści laktujących samic myszy laboratoryjnych (masa miotu jako zmienna ciągła w analizie różnic w temperaturze ciała oraz liczba młodych w miocie jako zmienna ciągła w analizie różnic w konsumpcji pokarmu i przyroście masy miotów).

	zmienne zależne									
	masa ciała		temperatura ciała		konsumpcja pokarmu		strawność pokarmu		tempo przyrostu masy miotu	
	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P
linia	34,25 _{1,112}	<0,0001 (+)	16,99 _{1,28}	0,0003 (+)	22,23 _{1,106}	<0,0001 (+)	20,81 _{1,102}	<0,0001 (-)	21,10 _{1,100}	<0,0001 (+)
temperatura	0,03 _{1,112}	0,9	21,99 _{1,28}	<0,0001 (-)	60,34 _{1,106}	<0,0001 (+)	86,07 _{1,102}	<0,0001 (-)	40,50 _{1,100}	<0,0001 (-)
immunizacja	0,33 _{1,112}	0,6	0,01 _{1,28}	0,9	0,2 _{1,106}	0,7	0,33 _{1,102}	0,6	0,03 _{1,100}	0,9
linia*temperatura	0,02 _{1,112}	0,9	40,80 _{1,28}	<0,0001	1,20 _{1,106}	0,3	0,00 _{1,102}	0,9	0,58 _{1,100}	0,5
linia*immunizacja	0,5 _{1,112}	0,5	20,96 _{1,28}	<0,0001	0,12 _{1,106}	0,7	0,05 _{1,102}	0,8	0,28 _{1,100}	0,6
immunizacja*temperatura	0,10 _{1,112}	0,7	18,68 _{1,28}	0,0002	0,03 _{1,106}	0,9	0,70 _{1,102}	0,4	6,21 _{1,100}	0,01
czas	11,34 _{6,672}	<0,0001	2,36 _{6,186}	0,03	16,70 _{5,530}	<0,0001	54,61 _{5,510}	<0,0001	1,65 _{5,500}	0,1
czas*linia	0,22 _{6,672}	0,9	0,41 _{6,186}	0,9	1,19 _{5,530}	0,3	0,68 _{5,510}	0,6	2,76 _{5,500}	0,01
czas*temperatura	1,95 _{6,672}	0,07	3,06 _{6,186}	0,007	4,08 _{5,530}	0,001	0,95 _{5,510}	0,5	1,00 _{5,500}	0,4
czas*immunizacja	1,66 _{6,672}	0,1	0,23 _{6,186}	0,9	0,79 _{5,530}	0,6	1,24 _{5,510}	0,3	0,30 _{5,500}	0,9

Wartość $P \leq 0,05$ oznaczona jest pogrubioną czcionką.

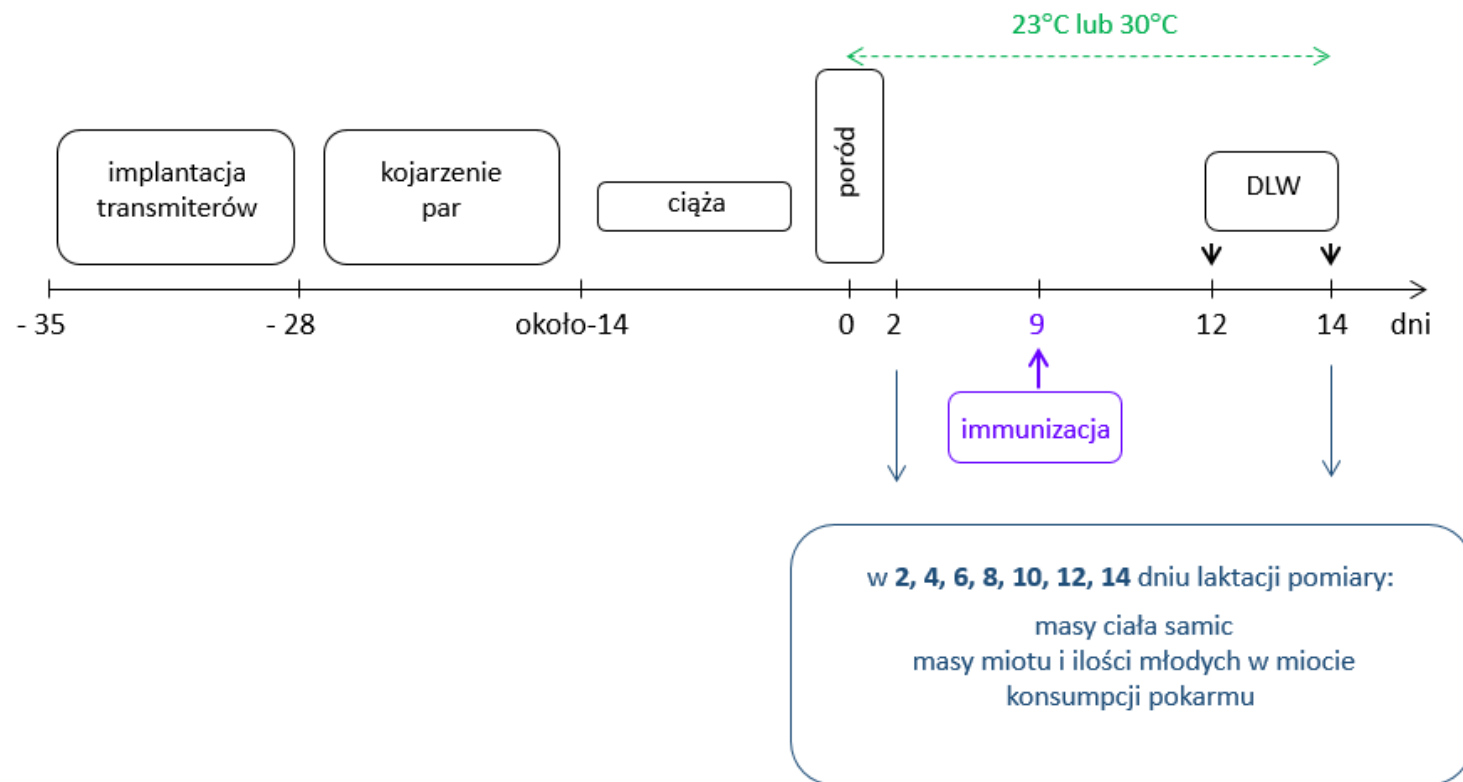
Znak (+) przy wartości P oznacza: H-BMR > L-BMR i 23°C > 30°C; natomiast znak (-) oznacza: L-BMR > H-BMR i 30°C > 23°C.

Tabela 5. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz immunizacji antygenem KLH na codzienne spożycie energii (DEI; *Daily Energy Intake*), ilość energii brutto pobieranej z pokarmu (GEI; *Gross Energy Intake*), zawartość energii w odchodach (GE_{feaces}; *Gross Energy of feaces*), ilość energii asymilowanej z pokarmu (MEI; *Metabolisable Energy Intake*), codzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*), kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) oraz poziom przeciwciał anty-KLH IgM u niepozbawionych sierści laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA ± SE (błąd standardowy) i korygowane o przyrost masy miotów między 12 a 14 dniem laktacji (z wyjątkiem poziomu przeciwciał anty-KLH IgM).

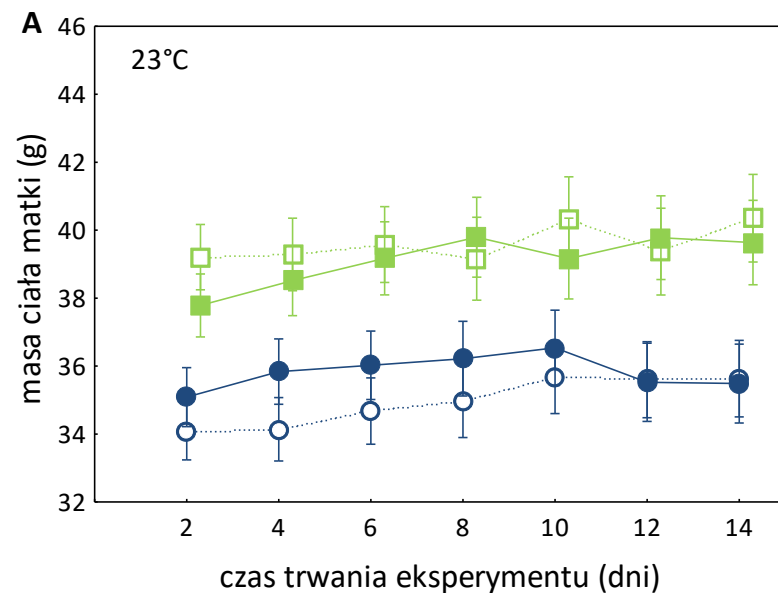
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	KLH	PBS
DEI	185,69 ± 7,59	167,77 ± 6,06	187,49 ± 8,01	166,70 ± 5,55	177,04 ± 7,13	176,01 ± 6,76
GEI	233,38 ± 9,76	207,87 ± 7,69	235,74 ± 10,31	206,53 ± 7,00	220,56 ± 9,18	220,23 ± 8,71
GE _{feaces}	47,69 ± 2,40	40,10 ± 1,71	48,25 ± 2,47	39,83 ± 1,61	43,52 ± 2,20	44,23 ± 2,12
MEI	180,58 ± 7,21	165,66 ± 5,27	185,68 ± 7,01	160,91 ± 4,87	174,73 ± 6,25	170,73 ± 6,56
DEE	110,09 ± 4,71	92,99 ± 3,01	110,10 ± 4,76	92,99 ± 2,94	104,02 ± 4,19	98,06 ± 4,143
MEO	70,49 ± 4,05	72,68 ± 3,83	75,58 ± 4,29	67,93 ± 3,47	70,71 ± 3,34	72,66 ± 4,60
anty-KLH IgM	0,36 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03

Tabela 6. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz immunizacji antygenem KLH na masę narządów aktywnych metabolicznie i limfatycznych u niepozbawionych sierści laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) i korygowane o masę matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę treści jelitowej i masę analizowanego narządu.

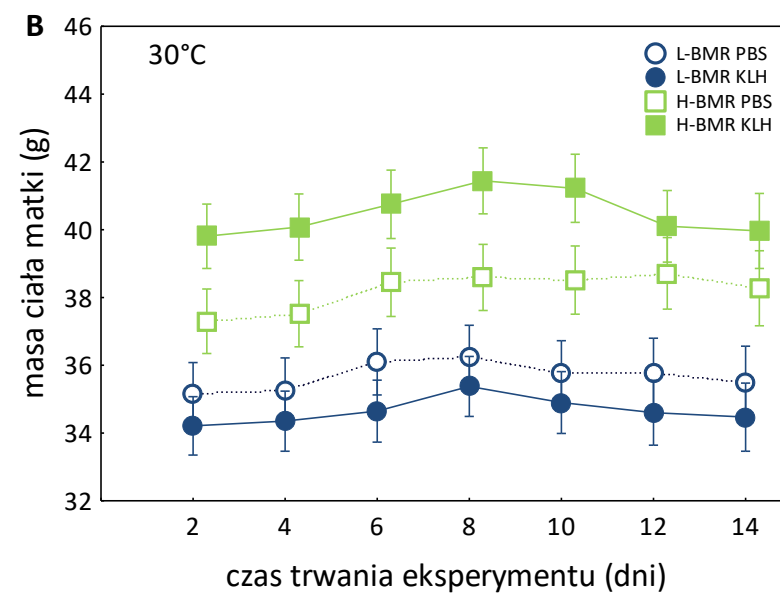
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	KLH	PBS
nerki	0,509 $\pm$ 0,010	0,373 $\pm$ 0,007	0,454 $\pm$ 0,013	0,413 $\pm$ 0,011	0,439 $\pm$ 0,012	0,428 $\pm$ 0,012
jelito	2,524 $\pm$ 0,072	1,899 $\pm$ 0,077	2,179 $\pm$ 0,076	2,186 $\pm$ 0,095	2,197 $\pm$ 0,094	2,167 $\pm$ 0,076
serce	0,166 $\pm$ 0,003	0,144 $\pm$ 0,002	0,156 $\pm$ 0,003	0,151 $\pm$ 0,003	0,154 $\pm$ 0,003	0,153 $\pm$ 0,003
wątroba	2,189 $\pm$ 0,057	1,804 $\pm$ 0,038	2,063 $\pm$ 0,058	1,893 $\pm$ 0,045	1,971 $\pm$ 0,057	1,987 $\pm$ 0,049
IBAT	0,044 $\pm$ 0,002	0,062 $\pm$ 0,002	0,054 $\pm$ 0,002	0,054 $\pm$ 0,002	0,053 $\pm$ 0,002	0,055 $\pm$ 0,002
grasica	0,036 $\pm$ 0,002	0,024 $\pm$ 0,001	0,027 $\pm$ 0,002	0,032 $\pm$ 0,002	0,029 $\pm$ 0,002	0,029 $\pm$ 0,002
śledziona	0,274 $\pm$ 0,014	0,150 $\pm$ 0,006	0,211 $\pm$ 0,015	0,200 $\pm$ 0,010	0,205 $\pm$ 0,013	0,206 $\pm$ 0,013
węzły chłonne	0,010 $\pm$ 0,0007	0,006 $\pm$ 0,0003	0,007 $\pm$ 0,0006	0,008 $\pm$ 0,0006	0,008 $\pm$ 0,0006	0,007 $\pm$ 0,0004



Rycina 12. Schemat przebiegu Eksperymentu 2, w którym niepozbowione sierści laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR poddane były ekspozycji do temperatury 30°C i immunizowane antygenem KLH. Opis ryciny znajduje się w tekście (Rozdział 3).

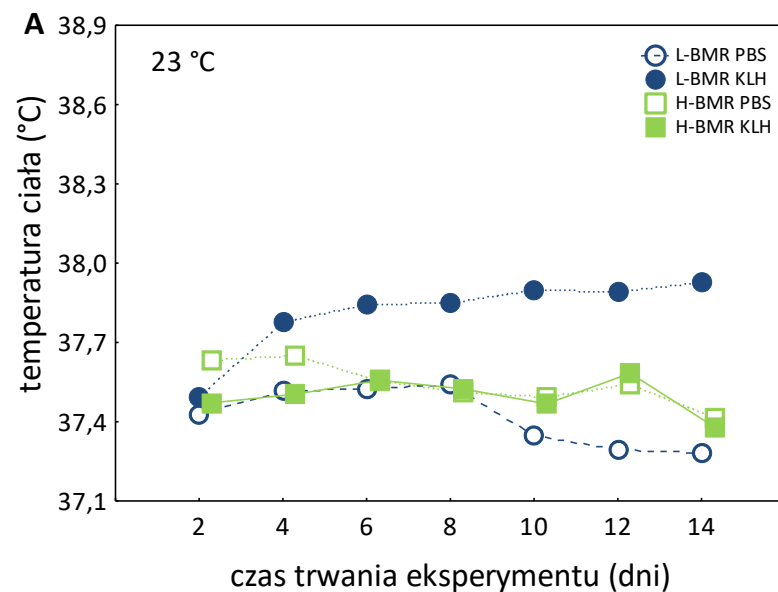


$P_{LINIA} = 0,0003$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

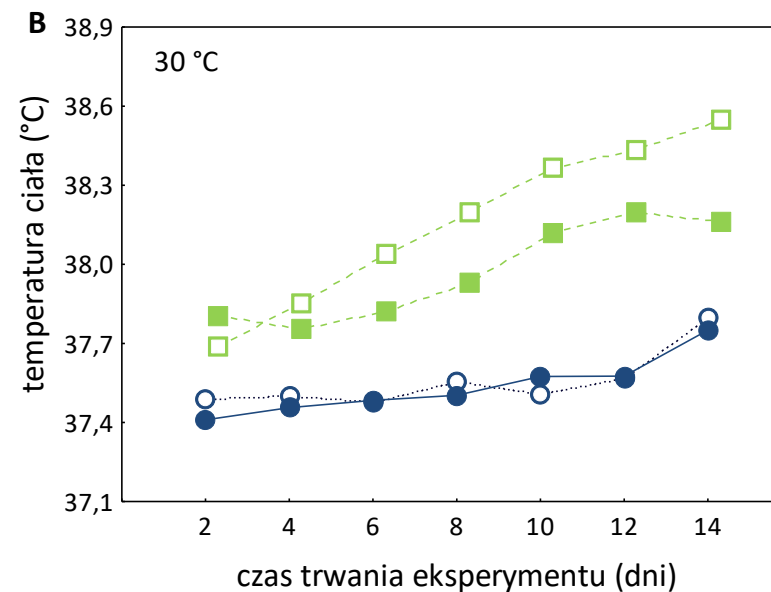


$P_{LINIA} < 0,0001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

Rycina 13. Zmiany masy ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C i immunizowanych antygenem KLH. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Zmiany masy ciała wyrażone są jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.

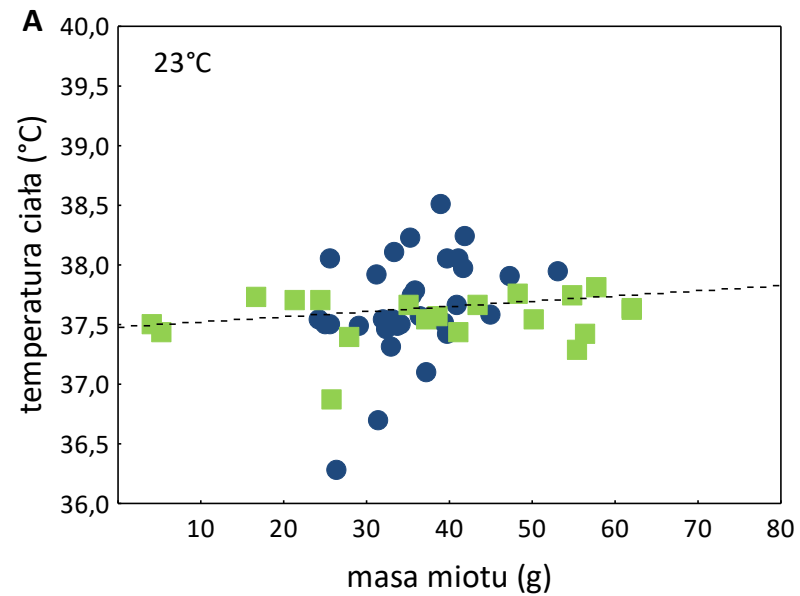


$P_{LINIA} = 0,05$
 $P_{IMMUNIZACJA} = 0,002$
 $P_{LINIA*IMMUNIZACJA} = 0,0003$

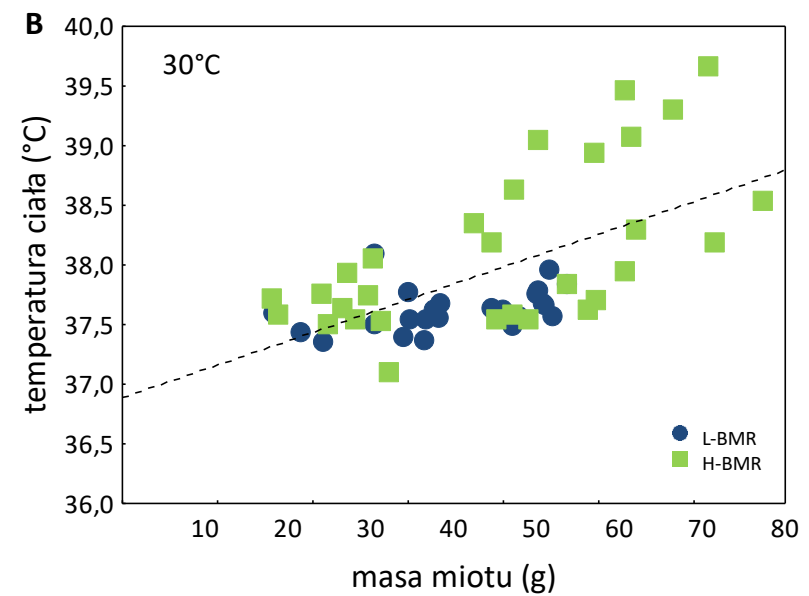


$P_{LINIA} < 0,0001$
 $P_{IMMUNIZACJA} = 0,02$
 $P_{LINIA*IMMUNIZACJA} = 0,04$
 $P_{CZAS} = 0,003$

Rycina 14. Zmiany temperatury ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Temperatura ciała wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o masę miotu).

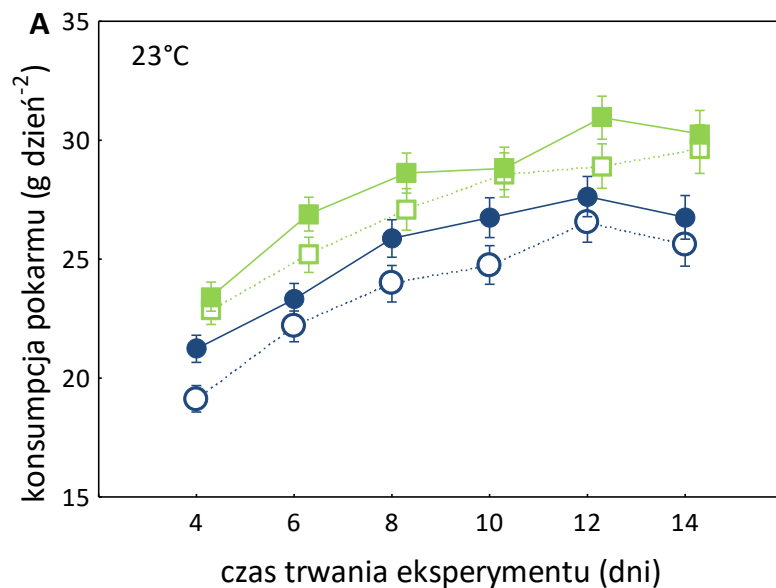


$P = 0,2$
 $R = 0,12$

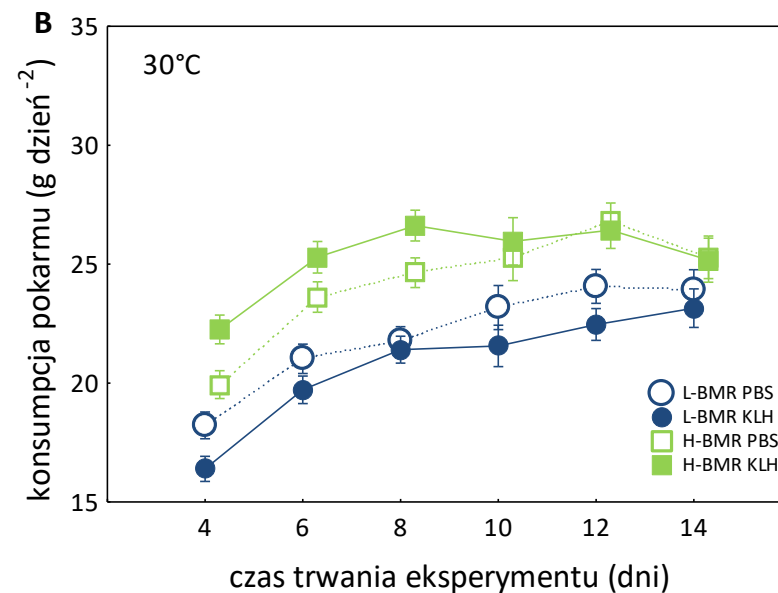


$P < 0,0001$
 $R = 0,60$

Rycina 15. Korelacja między masą miotu a średnią temperaturą ciała obserwowana w 14 dniu laktacji u samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści).

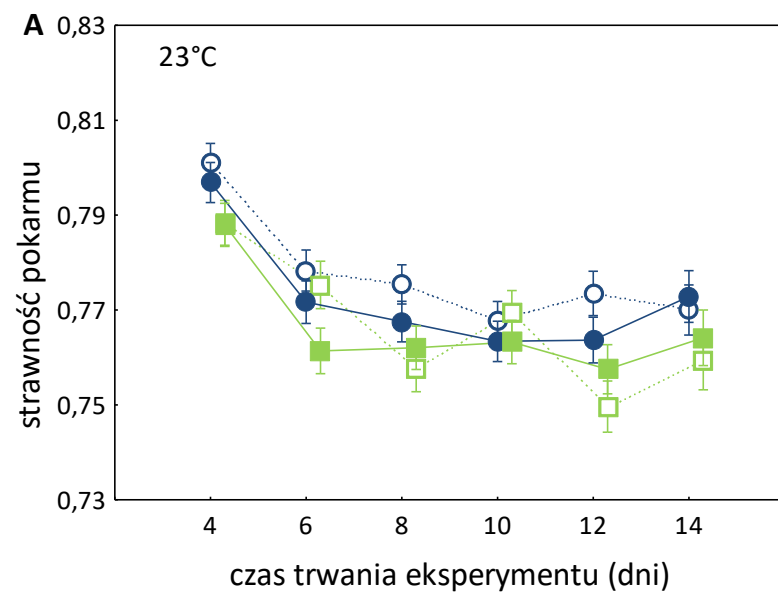


$P_{LINIA} < 0,0001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

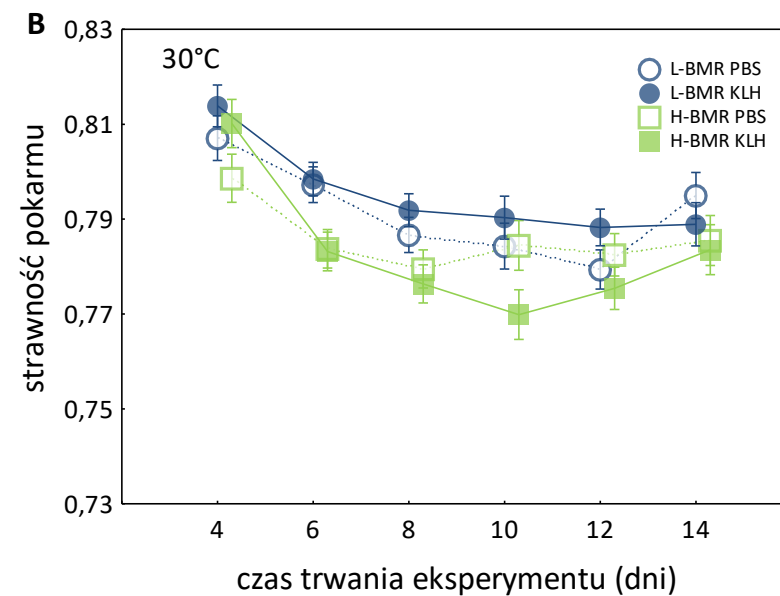


$P_{LINIA} = 0,001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

Rycina 16. Zmiany w konsumpcji pokarmu laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Konsumpcja pokarmu wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).

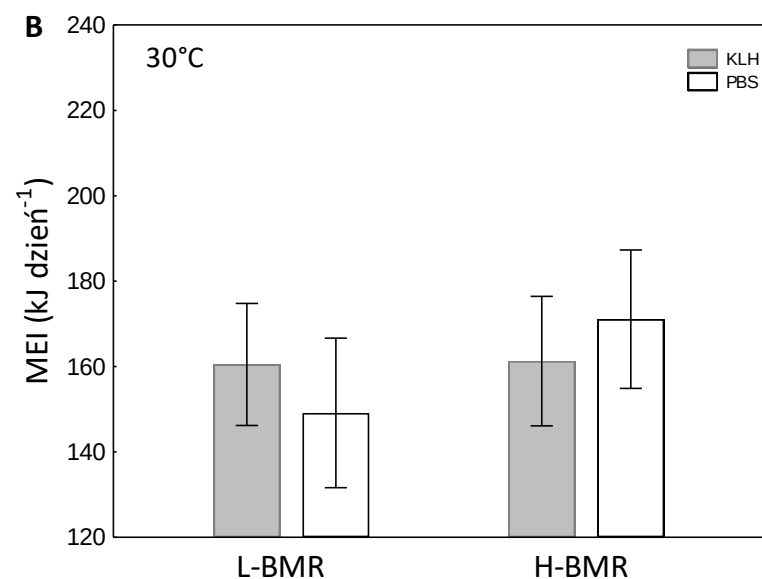
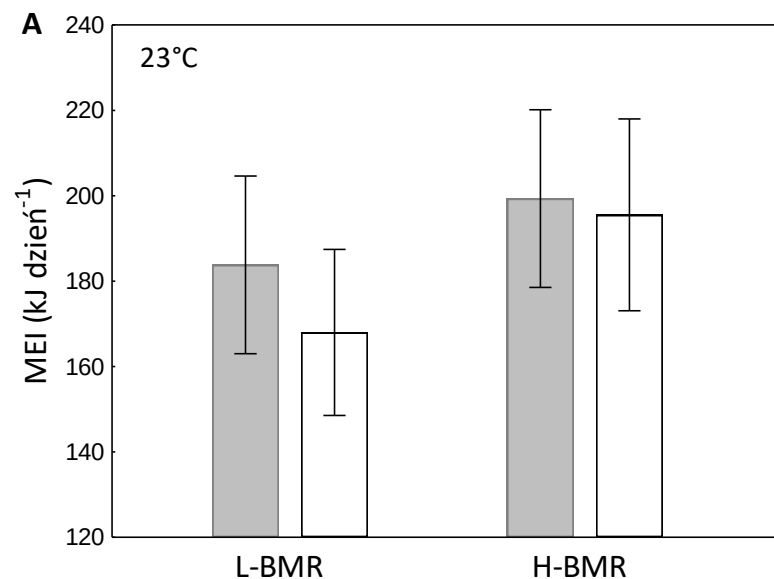


$P_{LINIA} = 0,004$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

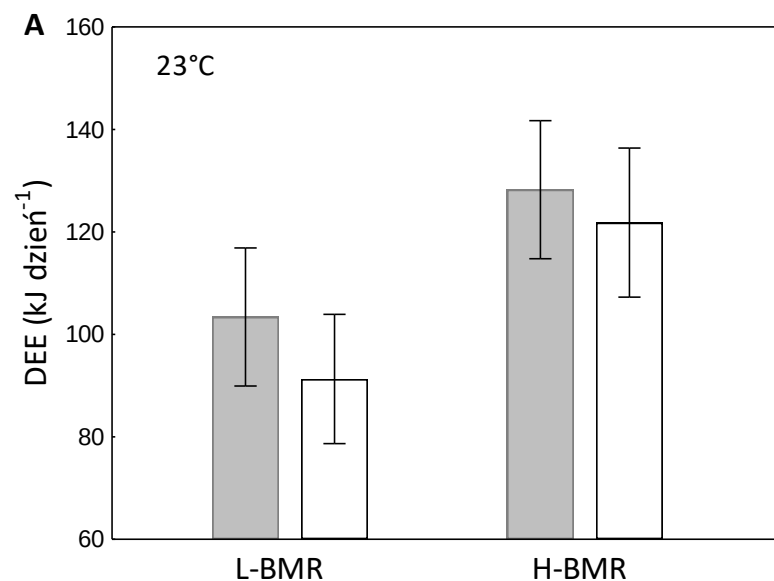


$P_{LINIA} = 0,0009$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

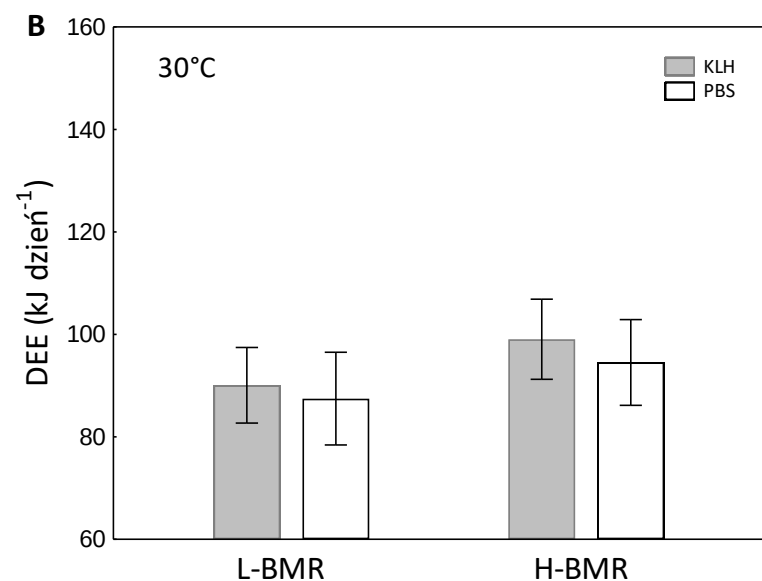
Rycina 17. Zmiany strawności pokarmu u laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Strawność pokarmu wyrażona jest jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.



Rycina 18. Wpływ immunizacji antygenem KLH na ilość energii metabolizowanej (MEI; *Metabolisable Energy Intake*) przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEI oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Wartość MEI wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

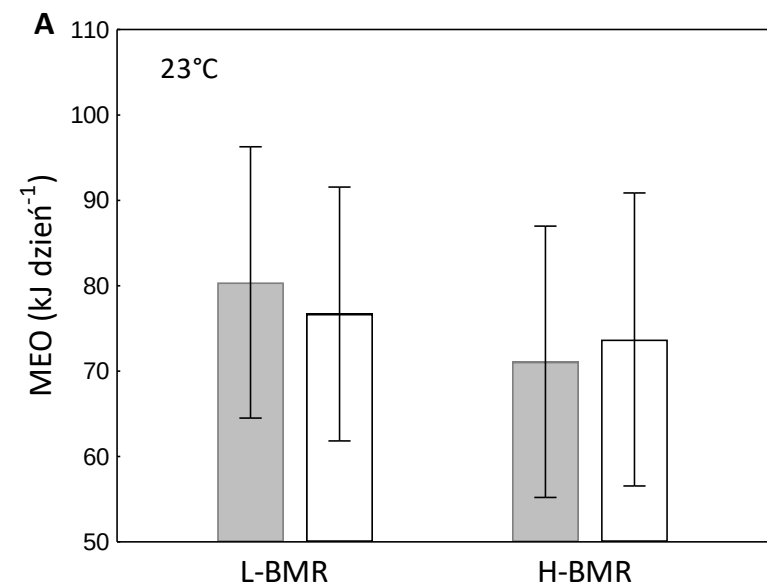
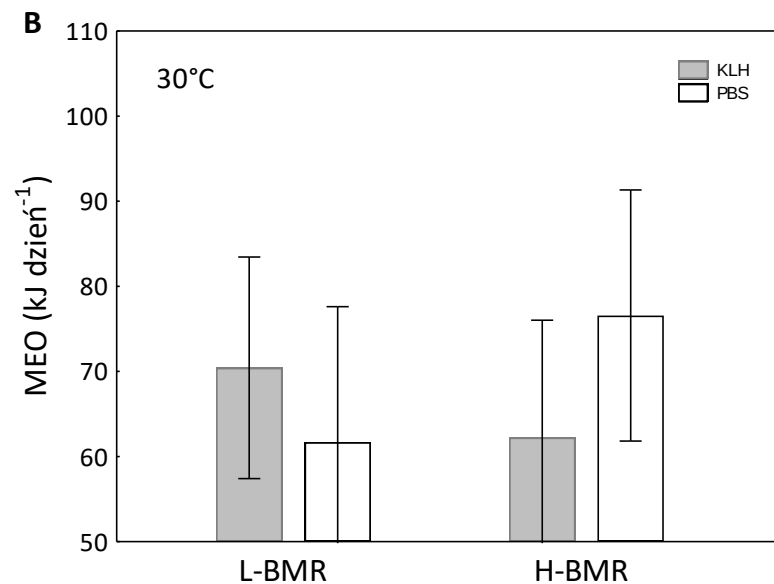


$P_{LINIA} = 0,0009$

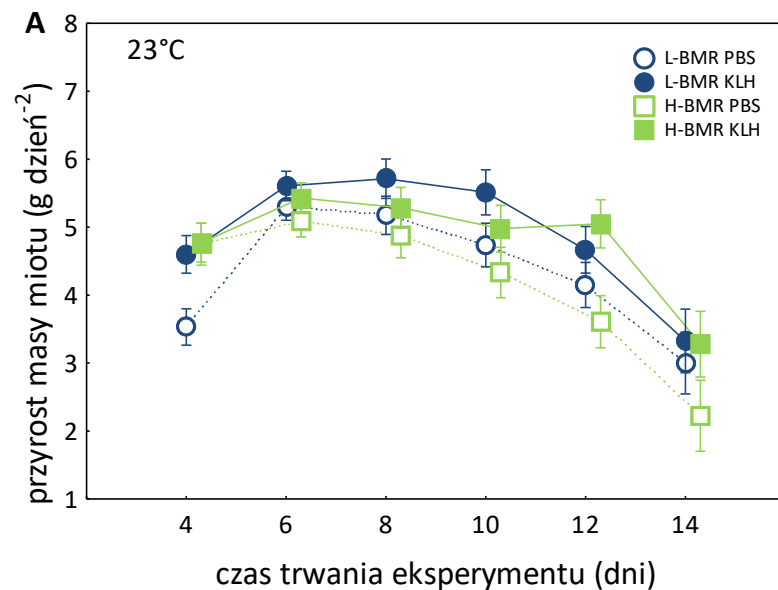


$P_{LINIA} = 0,05$

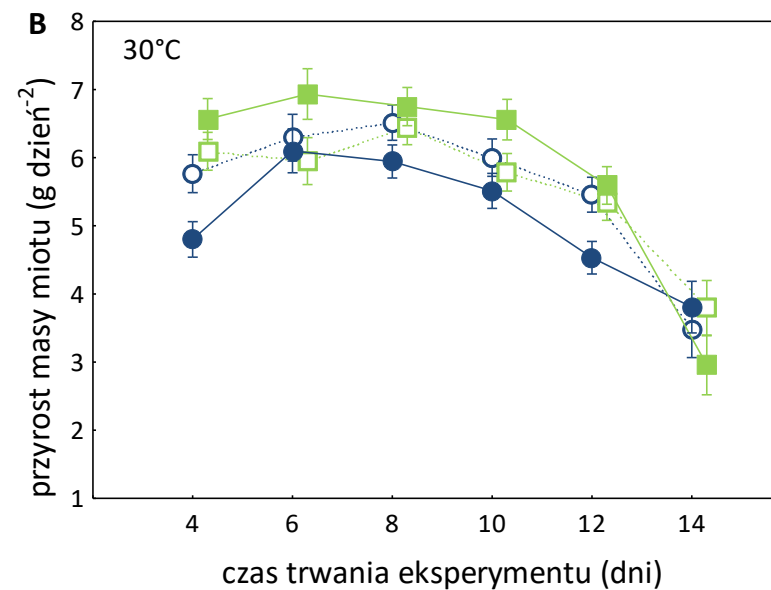
Rycina 19. Wpływ immunizacji antygenem KLH na dzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*) laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość DEE oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Wartość DEE wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.



Rycina 20. Wpływ immunizacji antygenem KLH na kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) produkowanego przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEO oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Wartość MEO wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.



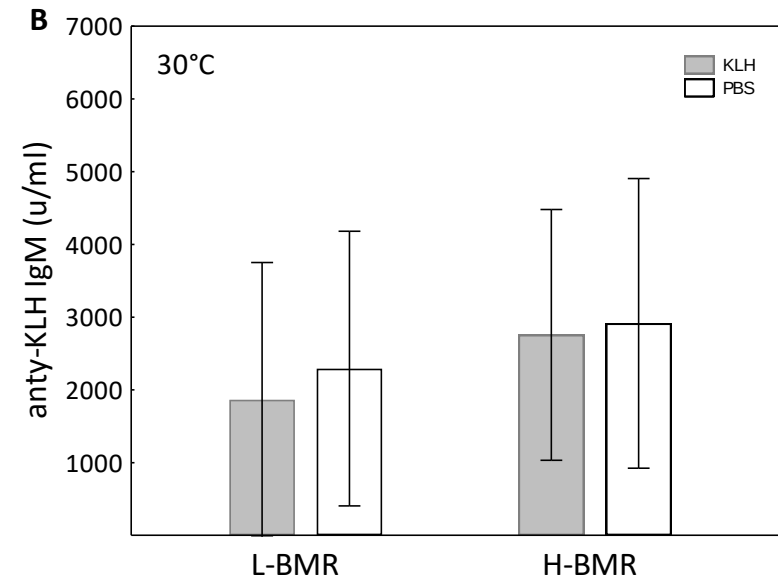
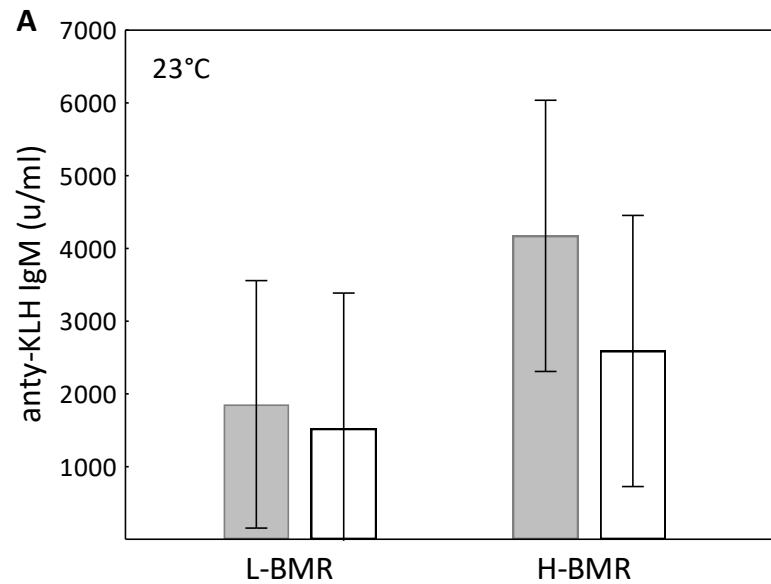
$P_{LINIA} = 0,0004$



$P_{LINIA} = 0,006$

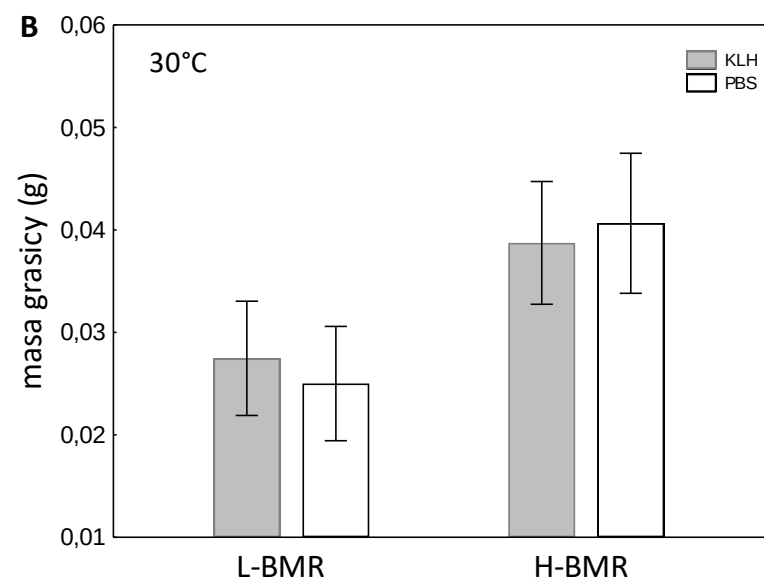
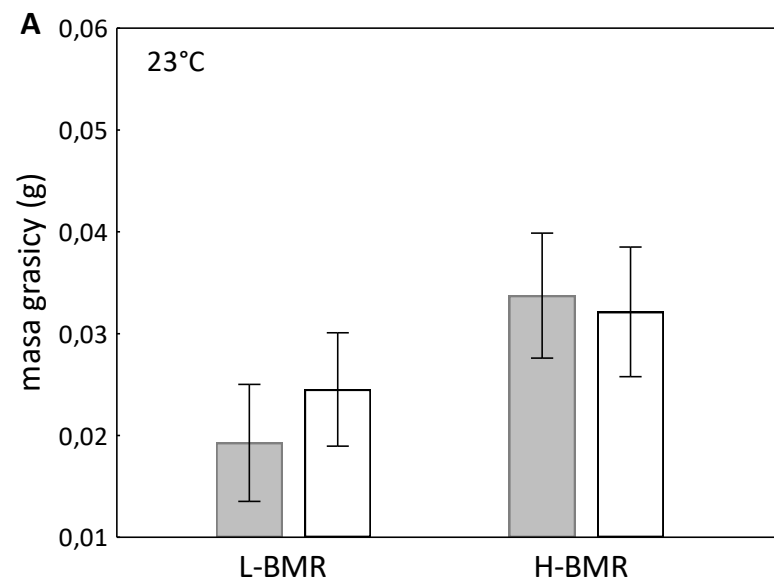
$P_{CZAS} < 0,0001$

Rycina 21. Zmiany tempa przyrostu masy miotów laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Przyrost masy miotów wyrażony jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).



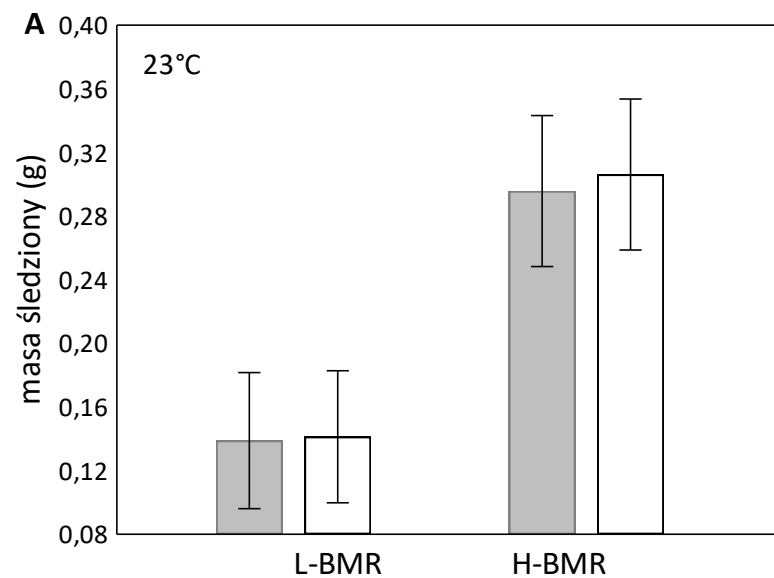
$P_{LINIA} = 0,05$

Rycina 22. Poziom przeciwciał anty-KLH u laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Poziom przeciwciał wyrażony jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy).

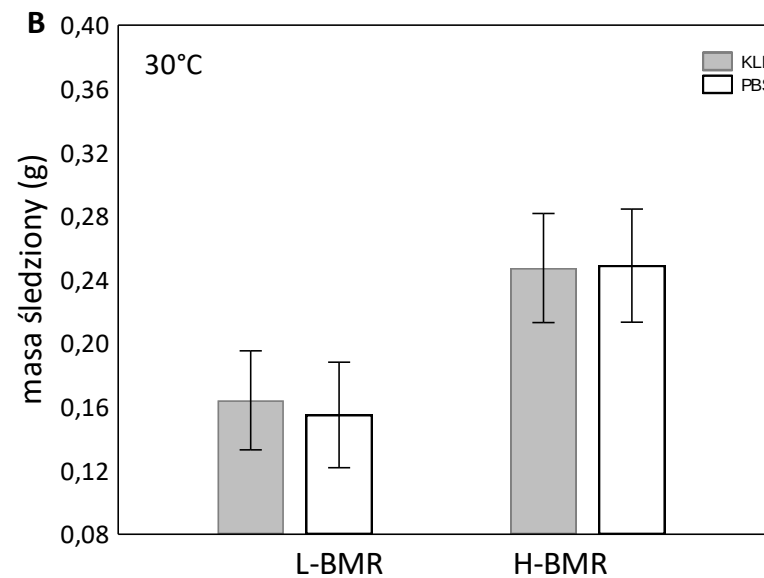


$P_{LINIA} = 0,007$

Rycina 23. Wpływ immunizacji antygenem KLH na masę grasicy laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Masa grasicy wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę grasicy.

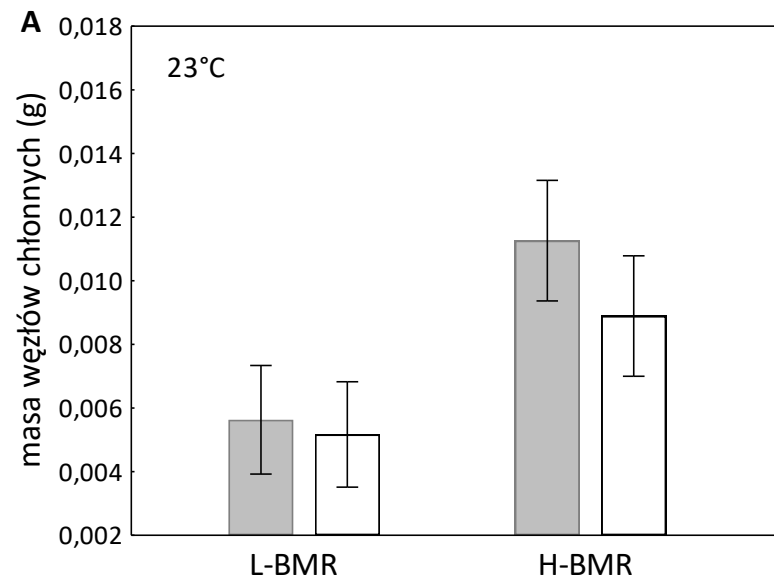


$P_{LINIA} < 0,0001$

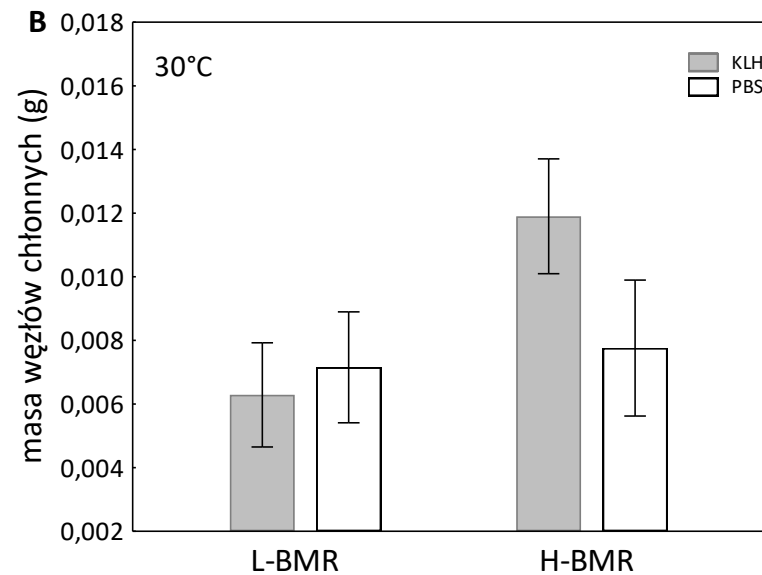


$P_{LINIA} < 0,0001$

Rycina 24. Wpływ immunizacji antygenem KLH na masę śledziony laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Masa śledziony wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę śledziony



$P_{LINIA} = 0,0003$



$P_{LINIA*IMMUNIZACJA} = 0,02$

Rycina 25. Wpływ immunizacji antygenem KLH na masę węzłów chłonnych laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Samice nie były pozbawione warstwy izolacyjnej (sierści). Masa węzłów chłonnych wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę węzłów.

4. Łączny wpływ golenia i immunizacji na wysiłek reprodukcyjny samic myszy laboratoryjnych różniących się tempem metabolizmu podstawowego (BMR)

Jak wspomniałam we Wstępie rozprawy, hipoteza HDL zakłada, że czynnikiem limitującym tempo produkcji i wydatkowania energii przez zwierzęta jest ich zdolność do rozpraszania metabolicznego ciepła (przegląd w Speakman i Król 2010). Testowanie słuszności założeń tej hipotezy oparłam na idei kompromisów (*trade-off*), gdzie podłożem do ich ujawniania, mają być ograniczenia w rozpraszaniu ciepła produkowanego podczas dwóch ciepłotwórczych procesów tj. wysiłku reprodukcyjnego i rozwoju odpowiedzi immunologicznej. W eksperymentach opisanych w poprzednich Rozdziałach, laktujące samice z linii o niskim lub wysokim poziomie BMR poddałam ekspozycji do temperatury 30°C tj. warunków bliskich górnej granicy strefy termoneutralnej, w których rozpraszanie ciepła przez matki powinno być utrudnione. W Eksperymentcie 1 (opis w Rozdziale 2), oprócz ekspozycji matek do wysokiej temperatury otoczenia, poddałam je procedurze usuwania sierści (by zmanipulować gradient temperatur między temperaturą ciała matek a temperaturą otoczenia). Założyłam, że usunięcie warstwy izolacyjnej w postaci sierści ułatwi samicom rozpraszanie ciepła, a w konsekwencji doprowadzi do zwiększenia wysiłku rodzicielskiego (w sposób zależny od przynależności do linii selekcyjnej). Eksperyment 2 (opis w Rozdziale 3) opierał się na immunizowaniu laktujących samic, wychowujących młode w temperaturze 30°C, antygenem KLH. Z uwagi na fakt, że rozwojowi reakcji obronnej, podobnie jak reprodukcji, towarzyszy produkcja ciepła (Luheshi 1998, Leshchinsky i Klasing 2001), spodziewałam się, że budżety energetyczne matek będą obciążone w sposób zależny od przynależności do linii selekcyjnej, co powinno doprowadzić do ujawniania się kompromisów między wysiłkiem rodzicielskim i reakcją obronną.

Celem opisanego tutaj Eksperymentu 3 była ocena wysiłku reprodukcyjnego i reakcji obronnej matek z linii L-BMR i H-BMR w odpowiedzi na jednoczesne zastosowanie dwóch manipulacji tj. ekspozycji do temperatury 30°C i immunizacji antygenem KLH. Eksperyment 3 przeprowadziłam zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 26 (szczegółowy opis poniżej). Eksperyment 3 miał pokazać, jak będzie wyglądał kompromis między wysiłkiem reprodukcyjnym a

budowaniem odpowiedzi immunologicznej u matek pozbawionych warstwy izolacyjnej.

Jeśli założenia hipotezy HDL są słuszne, eksperymentalne zniesienie limitów w rozpraszaniu ciepła powinno umożliwić matkom realizowanie dwóch kosztownych energetycznie funkcji fizjologicznych jednocześnie. Laktujące samice poddane immunizacji i pozbawione sierści powinny lepiej poradzić sobie z jednoczesnym wychowywaniem potomstwa oraz budowaniem reakcji obronnej w porównaniu do samic niegolonych (Eksperyment 2). Efekt golenia powinien być wyraźnie zauważalny w temperaturze 30°C, ale odpowiedź na zastosowane manipulacje powinna być różna w zależności od przynależności do linii selekcyjnej. Spodziewałam się, że pozbawione sierści samice z linii H-BMR będą miały podniesioną w tych warunkach zdolność do rozpraszania metabolicznego ciepła. Jednak nawet po usunięciu warstwy izolacyjnej, ze względu na i tak już wysokie tempo przemiany materii oraz dodatkowe obciążenie dwiema ciepłotwórczymi czynnościami, matki z wysokim BMR nie unikną fizycznych limitów w oddawaniu ciepła. Zakładałam, że w tej sytuacji, ujawni się u nich kompromis między opieką rodzicielską a rozwojem odpowiedzi immunologicznej. Matki uruchomią produkcję specyficznych przeciwciał anty-KLH IgM, ale tempo wzrostu ich młodych będzie porównywalne (lub nawet mniejsze) do niegolonych samic z tej linii w Eksperyment 2. Samice z linii L-BMR charakteryzują się niższym tempem przemiany materii i z racji tego ponoszą niższe koszty utrzymania organizmu, opieki rodzicielskiej i rozwoju reakcji obronnej w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii H-BMR. Sądziłam, że golone matki z niskim BMR w temperaturze 30°C mogą być ograniczane swoimi fizjologicznymi predyspozycjami do produkcji energii potrzebnej na realizację obu czynności jednocześnie, w tej sytuacji usunięcie warstwy izolacyjnej nie podniesie produkcji energii ponad te limity. Spodziewałam się zatem, że matki z linii L-BMR dadzą w tych warunkach priorytet wyłącznie reprodukcji (przyrost miotów będzie większy niż u niegolonych samic z linii L-BMR w Eksperyment 2).

4.1. Materiały i metody

4.1.1. Obiekt badań

W Eksperyment 3 kojarzeniu poddałam łącznie 160 samic myszy laboratoryjnych szczepu Swiss-Webster (po 80 samic z każdej linii selekcyjnej). Samice pochodziły z

pokolenia F55 sztucznego eksperymentu selekcyjnego prowadzonego w kierunku utrzymania niskiego i wysokiego tempa metabolizmu podstawowego. Wszystkie samice były w wieku około 18 tygodni. Szczegóły pomiaru tempa metabolizmu podstawowego, który służył potwierdzeniu przynależności myszy do linii L-BMR lub H-BMR znajdują się w Rozdziale 2 (Podrozdział 2.1.1.). Przed rozpoczęciem Eksperymentu 3 (podczas pomiarów BMR, potem w okresie ciąży), jak również w jego trakcie, myszy przebywały w klimatyzowanych pomieszczeniach o fotoperiodzie 12h/12h (12 godzin dzień/12 godzin noc). Wszystkie samice miały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Zwierzęta karmione były pełnowartościowym granulatem Labofeed produkowanym w Wytwórni Pasz A. Morawski (Kcynia).

4.1.2. Opis eksperymentu

Eksperyment 3 przebiegał według schematu przedstawionego na Rycinie 26. Przed kojarzeniem par w obrębie tej samej linii selekcyjnej, u 40 samic z linii L-BMR i 40 samic z linii H-BMR dootrzewnowo implantowałam transmittersy do monitorowania zmian temperatury ciała. W dniu porodu, po 40 losowo wybranych matek z linii L-BMR i linii H-BMR wraz z ich miotami poddałam ekspozycji do temperatury 30°C. Samice i ich młode z grupy kontrolnej (także 40 matek z linii L-BMR i tyle samo matek z linii H-BMR) pozostały w temperaturze 23°C. Przez cały okres laktacji samice wychowywały swoje naturalne mioty. W odróżnieniu od Eksperymentu 2, wszystkie matki poddałam procedurze golenia w 6 i 10 dniu po porodzie. W 9 dniu laktacji losowo wybrane samice z obu linii selekcyjnych, przetrzymywane w obu temperaturach, immunizowałam antygenem KLH (tj. 20 matek z linii L-BMR i 20 matek z linii H-BMR znajdujących się w temperaturze 23°C oraz 20 matek z linii L-BMR i 20 matek z linii H-BMR w temperaturze 30°C). Pozostałe samice (po 20 samic z obu linii selekcyjnych w temperaturze 23°C i po 20 samic z obu linii selekcyjnych w temperaturze 30°C) otrzymało iniekcję PBS. Podczas 14-dniowego okresu laktacji, w 2-dniowych odstępach czasu, kontrolowałam masę ciała i temperaturę ciała matek, konsumpcję i strawność pokarmu, masę miotu, liczbę młodych w miocie oraz tempo przyrostu masy miotów. W szczycie laktacji (między 12 i 14 dniem laktacji) oceniałam parametry związane z asymilacją pokarmu, takie jak GEI, GE_{feaces}, DEI, MEI oraz z wydatkowaniem wyprodukowanej energii, jak DEE oraz MEO. Na potrzeby Eksperymentu 3 stworzyłam

8 grup eksperymentalnych w układzie $2 \times 2 \times 2$ (tzn. linia L-BMR i H-BMR $\times$ temperatura 23°C i 30°C $\times$ KLH i PBS), jak już sygnalizowałam, wszystkie matki poddałam procedurze golenia. Wszystkie pomiary wykonałam z wykorzystaniem procedur szczegółowo opisanych w Podrozdziale 2.1. i Podrozdziale 3.1. W 14 dniu laktacji, samice uśmierciłam poprzez dyslokację kręgów szyjnych, pobrałam narządy aktywne metaboliczne (nerki, serce, wątrobę, jelito cienkie oraz brunatną tkankę tłuszczową) oraz narządy limfatyczne (grasicę, śledzionę i węzły chłonne pachwinowe), które zważyłam z dokładnością do 0,0001 g i zabezpieczyłam w temperaturze -80°C. Krew odwirowałam przy prędkości 2500 rpm w czasie 15 minut, surowicę zamroziłam w temperaturze -80°C i wykorzystałam do oceny poziomu przeciwciał anty-KLH IgM.

4.1.3. Analiza statystyczna

Ocenę masy ciała samic przed kojarzeniem w pary wykonałam za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA z przynależnością do linii selekcyjnej jako zmienną niezależną.

Zmiany w masie ciała i temperaturze ciała matek, w konsumpcji i strawności pokarmu oraz tempie przyrostu masy miotów badałam za pomocą 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Wszystkie wymienione zmienne zależne monitorowane były w 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 dniu laktacji, zmiennymi niezależnymi w analizie były przynależność do linii selekcyjnej (L-BMR lub H-BMR), temperatura otoczenia (23°C lub 30°C) oraz immunizacja (KLH lub PBS). W porównaniach służących ocenie zmian w temperaturze ciała matek, zmienną ciągłą była masa miotu w kolejnych dniach laktacji, w przypadku analizy różnic w konsumpcji pokarmu i tempie przyrostu masy miotów zmienną ciągłą stanowiła liczba młodych w miocie w kolejnych dniach laktacji.

Różnice w GEI, GE_{feaces} DEI, MEI, DEE, MEO, w masie narządów wewnętrznych aktywnych metabolicznie i limfatycznych oraz w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM oceniłam za pomocą 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA (zmienne niezależne takie same, jak wymieniałam powyżej). W analizie różnic w wyszczególnionych parametrach jako zmienną ciągłą zastosowałam różnicę w masie miotów dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Różnice w masie narządów

wewnętrznych korygowane były o masę matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę treści pokarmowej i masę badanego narządu.

Analizę różnic w wyszczególnionych powyżej zmiennych zależnych przeprowadziłam też oddzielnie w obrębie temperatury 23°C i 30°C, z wykorzystaniem 2-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA lub analizy ANOVA/ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, gdzie przynależność do linii selekcyjnej i immunizacja stanowiły zmienne niezależne, a zmienną ciągłą były zmienne wskazane powyżej w odniesieniu do poszczególnych porównań.

Różnice w masie ciała samic (zarówno przed reprodukcją, jak i w czasie trwania laktacji) oraz poziom przeciwciał anty-KLH zostały wyrażone jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Zmiany w temperaturze ciała matek, konsumpcji i strawności pokarmu, tempie przyrostu masy miotów, parametrach GEI, GE_{feces}, DEI, MEI, DEE i MEO oraz różnice w masie narządów wewnętrznych wyrażone zostały jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy ANOVA/ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy). Wyniki wszystkich analiz testowałam na poziomie istotności statystycznej $P = 0,05$. Analizy statystyczne wykonałam przy pomocy programu STATISTICA wersja 13.3.

4.2. Rezultaty

W analizach statystycznych uwzględniłam łącznie 143 samice wraz z ich miotami. Są to wszystkie matki, które wychowywały swoje młode do 14 dnia laktacji. Ostatecznie liczebność grup eksperymentalnych przedstawiała się w następujący sposób:

linia H-BMR, temperatura 23°C, grupa KLH: $n = 18$

linia H-BMR, temperatura 23°C, grupa PBS: $n = 22$

linia H-BMR, temperatura 30°C, grupa KLH: $n = 19$

linia H-BMR, temperatura 30°C, grupa PBS: $n = 22$

linia L-BMR, temperatura 23°C, grupa KLH: $n = 13$

linia L-BMR, temperatura 23°C, grupa PBS: $n = 18$

linia L-BMR, temperatura 30°C, grupa KLH: $n = 14$

linia L-BMR, temperatura 30°C, grupa PBS: $n = 17$.

4.2.1. Różnice w masie ciała matek

1-czynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała, że przed reprodukcją samice z linii L-BMR miały nieznacznie wyższą masę ciała w porównaniu do linii H-BMR ($F_{1,141} = 4,17$; $P = 0,04$).

Aby prześledzić zmiany w masie ciała matek w czasie 14-dniowej laktacji, wykonałam 3-czynnikową analizę wariancji ANOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami. Analiza wykazała, że masa ciała samic zmieniała się istotnie w czasie trwania eksperymentu ($P < 0,0001$; Tabela 7). Największe zmiany w masie ciała samic w czasie laktacji zaobserwowałam u matek z linii H-BMR (interakcja czas $\times$ linia selekcyjna; $P < 0,0001$; Tabela 7). Ponadto, istotna okazała się interakcja między czasem trwania eksperymentu a temperaturą otoczenia, wskazująca na szybsze zmiany w masie ciała matek laktujących w 23°C ($P = 0,02$; Tabela 7). Spośród trzech zmiennych niezależnych w analizie, wpływ na masę ciała miała jedynie przynależność do linii selekcyjnej. Większą masę ciała miały matki z linii H-BMR w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii o niskim BMR ($P < 0,0001$; Tabela 7). Temperatura otoczenia ($P = 0,3$) oraz immunizacja antygenem KLH ($P = 0,7$) nie miały wpływu na masę ciała samic (Tabela 7). Istotna była interakcja temperatura otoczenia $\times$ immunizacja, co pokazuje, że najmniejszą masę ciała miały matki umieszczone w 30°C i poddane iniekcji roztworem PBS ($P = 0,01$; Tabela 7). Interakcja linia selekcyjna $\times$ temperatura otoczenia oraz linia selekcyjna $\times$ immunizacja okazały się być nieistotne statystycznie ($P = 0,6$ w obu przypadkach; Tabela 7).

Analizy dotyczące różnic w masie ciała samic wykonałam także osobno dla obu temperatur otoczenia. W 23°C masa ciała matek zmieniała się w czasie trwania laktacji (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,366} = 13,91$; $P < 0,0001$; Rycina 27A). Zmiany masy ciała w czasie trwania laktacji były takie same w obu liniach selekcyjnych (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,366} = 0,92$; $P = 0,5$), nie różniły się też między grupą KLH i PBS (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,366} = 0,39$; $P = 0,9$). Na masę ciała matek wpływ miała przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANOVA, $F_{1,61} = 22,73$; $P < 0,0001$), przy czym cięższe były samice z wysokim BMR. Immunizacja nie wpływała na masę ciała samic (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,61} = 2,50$; $P = 0,1$; Rycina 27A). Interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie była istotna statystycznie (2-czynnikowa ANOVA $F_{1,61} = 0,23$; $P = 0,6$).

Analizy wykonane w 30°C potwierdziły wpływ czasu trwania laktacji na masę ciała matek (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,396} = 8,59$; $P < 0,0001$; Rycina 27B). Zmiany masy ciała samic w czasie laktacji były większe w obrębie linii z wysokim BMR (2-czynnikowa ANOVA; $F_{6,396} = 8,21$; $P < 0,0001$). Obie zmienne niezależne okazały się mieć wpływ na masę ciała matek umieszczonych w 30°C. Matki z linii H-BMR były cięższe od matek z niskim tempem metabolizmu (2-czynnikowa $F_{1,66} = 27,65$; $P < 0,0001$; Rycina 27B). Niezależnie od efektu linii selekcyjnej, matki immunizowane antygenem KLH były cięższe od matek poddanych iniekcji roztworem PBS (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,66} = 4,36$; $P = 0,04$; Rycina 27B). Interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie była istotna statystycznie (2-czynnikowa ANOVA $F_{1,66} = 0,04$; $P = 0,8$).

4.2.2. Różnice w temperaturze ciała matek

Analizy pokazały, że temperatura ciała samic zmieniała się w czasie trwania eksperymentu (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,02$; Tabela 7). Istotna okazała się interakcja czas $\times$ temperatura otoczenia, wskazująca na większe zmiany temperatury ciała u matek poddanych ekspozycji do 23°C (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,03$; Tabela 7). Interakcje czas $\times$ linia selekcyjna (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,9$; Tabela 7) oraz czas $\times$ immunizacja (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,9$; Tabela 7) okazały się nieistotne statystycznie. Wpływ na temperaturę ciała matek miała przynależność do linii selekcyjnej (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,0007$; Tabela 7) oraz temperatura otoczenia (3-czynnikowa ANCOVA; $P < 0,0001$; Tabela 7). Istotna interakcja linia selekcyjna $\times$ temperatura otoczenia pokazała, że matki z linii L-BMR miały najwyższą temperaturę ciała w 23°C (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,02$ Tabela 7). Immunizacja nie wpływała na temperaturę ciała matek (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,7$; Tabela 7). Interakcje linia selekcyjna $\times$ immunizacja oraz immunizacja $\times$ temperatura otoczenia nie były istotne statystycznie (3-czynnikowa ANCOVA; $P > 0,09$ w obu przypadkach).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami, wykonana w obrębie temperatury 23°C wykazała, że temperatura ciała matek nie zmieniała się w czasie laktacji ($F_{6,168} = 0,59$; $P = 0,7$; Rycina 28A). Nieistotne okazały się interakcje czas $\times$ linia selekcyjna ($F_{6,168} = 0,52$; $P = 0,8$) oraz czas $\times$ immunizacja ($F_{1,68} = 0,17$; $P = 0,9$). Matki z linii L-BMR miały wyższą temperaturę ciała w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii H-BMR ($F_{1,27} = 17,59$; $P = 0,0003$; Rycina 28A).

Immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na temperaturę ciała matek w 23°C ($F_{1,27} = 1,09$; $P = 0,3$; Rycina 28A), interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja też nie była istotna statystycznie ($F_{1,27} = 0,41$; $P = 0,5$).

W 30°C matki z przeciwnych linii selekcyjnych miały taką samą temperaturę ciała ($F_{1,24} = 0,80$; $P = 0,4$; Rycina 28B), podobnie jak matki z grupy KLH i PBS ($F_{1,24} = 2,28$; $P = 0,1$). Temperatura ciała matek zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($F_{6,150} = 3,98$; $P = 0,001$), zmiany te były jednak takie same w obu liniach selekcyjnych ($F_{6,150} = 0,12$; $P = 0,9$), jak również grupie KLH i PBS ($F_{6,150} = 0,16$; $P = 0,9$). Analiza korelacji wykazała, że w temperaturze 23°C masa miotu była pozytywnie skorelowana z temperaturą ciała matek ($P = 0,001$; $r = 0,55$; Rycina 29A). Z rozkładu punktów na rycinie wynika, że matki z linii H-BMR wychowujące najcięższe mioty miały też najwyższą temperaturę ciała. Zależność między masą miotu a temperaturą ciała nie była istotna w temperaturze 30°C ($P = 0,5$; $r = 0,12$; Rycina 29B).

4.2.3. Różnice w konsumpcji pokarmu, strawności i ilości asymilowanej energii

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA dla układów z powtórzonymi pomiarami wykazała, że ilość pobieranego przez samice pokarmu zmieniała się w czasie trwania eksperymentu ($P < 0,0001$; Tabela 7). Zmiany te były większe u matek w temperaturze 23°C (czas $\times$ temperatura otoczenia; $P = 0,01$; Tabela 7). Na ilość spożywanego przez matki pokarmu wpływała przynależność do linii selekcyjnej oraz temperatura otoczenia. Wyższą konsumpcją pokarmu charakteryzowały się matki z wysokim BMR w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR ($P < 0,0001$; Tabela 7). Niezależnie od efektu przynależności do linii selekcyjnej, konsumpcja pokarmu była wyższa u matek laktujących w 23°C w porównaniu do 30°C ($P < 0,0001$; Tabela 7). Immunizacja nie wpływała na ilość konsumowanego przez matki pokarmu ($P = 0,5$; Tabela 7). Interakcje między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie ($P > 0,4$ we wszystkich przypadkach).

Analizy wykonane wyłącznie w obrębie temperatury 23°C potwierdziły wpływ czasu na konsumpcję pokarmu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,285} = 8,03$; $P < 0,0001$; Rycina 30A). Zmiany konsumpcji pokarmu w czasie nie zależały jednak od przynależności do linii selekcyjnej, jak również od immunizacji (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,285} = 1,49$; $P = 0,2$ oraz $F_{5,285} = 1,06$; $P = 0,4$). W tej temperaturze matki z linii H-BMR

miały konsumpcję pokarmu wyższą w porównaniu do samic z linii L-BMR (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,57} = 10,48$; $P = 0,002$; Rycina 30A). Nie było efektu immunizacji (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,57} = 0,12$; $P = 0,7$), interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja też nie była istotna (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,57} = 0,24$; $P = 0,6$). W 30°C konsumpcja pokarmu nie zmieniała się w czasie (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,295} = 1,45$; $P = 0,2$). Interakcje czas $\times$ linia selekcyjna oraz czas $\times$ immunizacja okazały się nieistotne statystycznie (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{5,295} = 0,73$; $P = 0,6$ oraz $F_{5,295} = 1,19$; $P = 0,3$). Istotny wpływ na ilość konsumowanego pokarmu miała wyłącznie przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,59} = 22,64$; $P < 0,0001$; Rycina 30B). Immunizacja nie wpływała na konsumpcję pokarmu (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,59} = 0,12$; $P = 0,7$), interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie była istotna statystycznie (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,59} = 0,55$; $P = 0,2$).

Efektywność trawienia pokarmu zmieniała się w kolejnych dniach laktacji ($P < 0,0001$; Tabela 7), przy czym zmiany te były największe u matek z linii L-BMR (3-czynnikowa ANOVA; $P = 0,01$; Tabela 7). Zmiany strawności pokarmu w czasie były również zależne od temperatury otoczenia i były większe w temperaturze 23°C (3-czynnikowa ANOVA; $P = 0,004$; Tabela 7). Z trawieniem pokarmu lepiej radziły sobie matki poddane ekspozycji do 30°C w porównaniu do matek w 23°C (3-czynnikowa ANOVA; $P < 0,0001$; Tabela 7). Niezależnie od efektu temperatury otoczenia, matki z linii L-BMR charakteryzowały się lepszą strawnością pokarmu od ich odpowiedniczek z wysokim BMR (3-czynnikowa ANOVA; $P = 0,0004$; Tabela 7), Immunizacja nie miała wpływu na strawność pokarmu (3-czynnikowa ANOVA; $P = 0,9$; Tabela 7). Interakcje między zmiennymi niezależnymi nie były istotne statystycznie (3-czynnikowa ANOVA; $P > 0,2$ we wszystkich przypadkach; Tabela 7).

Analizy wykonane osobno dla obu temperatur otoczenia potwierdziły, że stawność pokarmu zmieniała się w czasie laktacji (2-czynnikowa ANOVA; $F_{5,280} = 90,62$; $P < 0,0001$ dla 23°C oraz $F_{5,325} = 54,50$; $P < 0,0001$ dla 30°C). W 23°C największe zmiany w stawności pokarmu obserwowałam u matek z linii o niskim BMR (2-czynnikowa ANOVA; interakcja czas $\times$ linia selekcyjna; $F_{5,280} = 3,58$; $P = 0,004$; Rycina 31A). Istotna okazała się też interakcja czas $\times$ immunizacja, zmiany w strawności pokarmu w czasie były największe u matek z grupy KLH (2-czynnikowa ANOVA; $F_{5,280} = 2,59$; $P = 0,003$; Rycina 31A). Przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,56} = 3,16$; $P =$

0,08), immunizacja (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,56} = 0,67$; $P = 0,4$) oraz interakcja między tymi zmiennymi (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,56} = 0,53$; $P = 0,5$) nie miały wpływu na strawność pokarmu w 23°C. W 30°C lepszą strawność pokarmu miały matki z linii L-BMR w porównaniu do samic z wysokim BMR (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,65} = 13,67$; $P = 0,0005$; Rycina 31B). Efekt immunizacji był nieistotny statystycznie (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,65} = 0,76$; $P = 0,4$), podobnie jak interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja (2-czynnikowa ANOVA; $F_{1,65} = 0,14$; $P = 0,7$).

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA pokazała, że ekspozycja matek do temperatury 30°C skutkowała obniżeniem ilości energii brutto pobieranej z pokarmu (GEI; $F_{1,74} = 39,80$; $P < 0,0001$), niższą zawartością energii w odchodach matek (GE_{feaces} ; $F_{1,75} = 40,23$; $P < 0,0001$), niższym dziennym spożyciem energii (DEI; $F_{1,73} = 45,36$; $P < 0,0001$) oraz niższą ilością energii przyswajanej z pokarmu (MEI; $F_{1,65} = 38,88$; $P < 0,0001$) w porównaniu do matek w temperaturze 23°C (Tabela 8). Niezależnie od efektu temperatury, wartość GEI, GE_{feaces} , DEI oraz MEI większa była u matek z linii H-BMR w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR ($F_{1,74} = 19,31$; $P < 0,0001$; $F_{1,75} = 19,55$; $P < 0,0001$; $F_{1,73} = 27,69$; $P < 0,0001$ oraz $F_{1,65} = 25,18$; $P < 0,0001$; Tabela 8). Immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na wartość wymienionych parametrów ($P > 0,4$ we wszystkich przypadkach; Tabela 8).

Po wykonaniu 2-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA dla obu temperatur osobno zauważyłam, że w temperaturze 23°C wartość GEI ($F_{1,35} = 8,09$; $P = 0,007$), GE_{feaces} ($F_{1,35} = 8,09$; $P = 0,007$), DEI ($F_{1,35} = 8,17$; $P = 0,007$) oraz MEI ($F_{1,35} = 7,78$; $P = 0,009$; Rycina 32A) była większa u matek z linii o wysokim BMR w porównaniu do matek z linii L-BMR. Wpływ immunizacji antygenem KLH, jak również interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja, nie wpływały na żaden z wymienionych parametrów ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach). Analogiczny trend występował w temperaturze 30°C. Wartość GEI, GE_{feaces} , DEI oraz MEI także była większa u laktujących samic z linii o wysokim BMR (odpowiednio $F_{1,37} = 8,09$; $P = 0,007$; $F_{1,38} = 14,44$; $P = 0,0005$; $F_{1,36} = 20,34$; $P < 0,0001$ oraz $F_{1,33} = 16,62$; $P = 0,0002$; Rycina 32B). Podobnie, jak w temperaturze 23°C, wpływ immunizacji antygenem KLH, jak również interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja, nie były istotne w przypadku żadnego z badanych parametrów w 30°C ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach).

4.2.4. Różnice w dziennych wydatkach energetycznych i ilości energii w mleku

Ekspozycja matek do temperatury 30°C skutkowała obniżeniem ich dziennych wydatków energetycznych (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,65} = 31,83$; $P < 0,0001$; Tabela 8). Poziom DEE nie zależał od przynależności do linii selekcyjnej (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,65} = 1,42$; $P = 0,2$) jak również od immunizacji (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,65} = 0,003$; $P = 0,9$; Tabela 8). Interakcja między tymi dwiema zmiennymi niezależnymi okazała się być istotna statystycznie. Dzielne wydatki energetyczne były największe u immunizowanych matek z linii H-BMR (3-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,65} = 7,90$; $P = 0,006$). Interakcja ta istotna była także po wykonaniu porównań wyłącznie w obrębie temperatury 23°C ($F_{1,29} = 5,07$; $P = 0,03$; Rycina 33A). Kierunek zależności został utrzymany. Interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w 30°C ($F_{1,33} = 2,76$; $P = 0,1$). Zmienne niezależne, przynależność do linii selekcyjnej (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,29} = 0,00$; $P = 1,0$ dla 23°C oraz $F_{1,33} = 3,12$; $P = 0,1$ dla 30°C) i immunizacja (2-czynnikowa ANCOVA; $F_{1,29} = 0,01$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{1,33} = 0,20$; $P = 0,7$ dla 30°C) nie miały wpływu na poziom DEE w obu temperaturach.

3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA ujawniła, że ekspozycja matek do wysokiej temperatury otoczenia nie wpływa na ilość energii zawartej w mleku ($F_{1,65} = 3,50$; $P = 0,07$; Tabela 8). Matki z przeciwnych linii selekcyjnych różniły się jednak kalorycznością produkowanego mleka. Matki z linii H-BMR miały wyższą wartość MEO w porównaniu do matek z niskim BMR ($F_{1,65} = 19,43$; $P < 0,0001$; Tabela 8). Immunizacja nie miała wpływu na kaloryczność mleka ($F_{1,65} = 0,92$; $P = 0,3$; Tabela 8). Po wykonaniu 2-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA osobno dla 23°C i 30°C okazało się, efekt przynależności do linii selekcyjnej istotny był w obu temperaturach. Kaloryczność mleka wyższa była u matek z linii H-BMR ($F_{1,30} = 7,92$; $P = 0,01$ dla 23°C oraz $F_{1,33} = 10,09$; $P = 0,003$ dla 30°C; Rycina 34A i B). W obu temperaturach wpływ immunizacji na wartość MEO, jak również interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja nie były statystycznie istotne ($P > 0,07$ we wszystkich przypadkach).

4.2.5. Różnice w tempie przyrostu masy miotów

Analiza pokazała, że przyrost masy miotów nie zmieniał się w czasie laktacji ($P = 0,9$), nieistotne statystycznie były również interakcje między czasem trwania eksperymentu a zmiennymi niezależnymi (3-czynnikowa ANCOVA; $P > 0,2$ we wszystkich przypadkach;

Tabela 7). Przyrost masy miotów zależał jedynie od temperatury otoczenia, szybciej przyrastały mioty matek laktujących w 30°C niż warunkach kontrolnych 23°C (3-czynnikowa ANCOVA; $P < 0,0001$; Tabela 7). Przynależność do linii selekcyjnej (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,3$) oraz immunizacja antygenem KLH (3-czynnikowa ANCOVA; $P = 0,8$) nie wpływały na tempo przyrostu masy miotów (Tabela 7).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykonana w obu temperaturach osobno nie wykazała istotnego wpływu czasu, przynależności do linii selekcyjnej oraz immunizacji na tempo przyrostu masy miotów zarówno w 23°C, jak i 30°C ($P > 0,2$ we wszystkich przypadkach; Rycina 35A i B). Żadna z interakcji nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($P > 0,2$ we wszystkich przypadkach).

4.2.6. Różnice w poziomie przeciwciał anty-KLH IgM

Poziom przeciwciał anty-KLH IgM był taki sam w obu temperaturach (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,83} = 0,07$; $P = 0,8$), taki sam u matek w linii L-BMR i H-BMR (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,83} = 2,52$; $P = 0,1$), nie różnił się też między grupą KLH i PBS (3-czynnikowa ANOVA; $F_{1,83} = 1,46$; $P = 0,2$; Tabela 8). Interakcje między zmiennymi niezależnymi okazały się być nieistotne statystycznie (3-czynnikowa ANOVA; $P > 0,1$ we wszystkich przypadkach).

2-czynnikowa analiza wariancji ANOVA w 23°C i 30°C potwierdziła schemat obserwowany w modelu głównym. W obu temperaturach poziom przeciwciał anty-KLH IgM nie zależał od przynależności do linii selekcyjnej ($F_{1,41} = 0,49$; $P = 0,5$ dla 23°C oraz $F_{1,41} = 2,86$; $P = 0,09$ dla 30°C), immunizacji antygenem KLH ($F_{1,41} = 0,41$; $P = 0,5$ dla 23°C oraz $F_{1,41} = 1,40$; $P = 0,2$ dla 30°C) oraz interakcji linia selekcyjna $\times$ immunizacja ($F_{1,41} = 0,007$; $P = 0,9$ dla 23°C oraz $F_{1,41} = 0,71$; $P = 0,4$ dla 30°C; Rycina 36A i B).

4.2.7. Różnice w masie narządów wewnętrznych

Jak pokazała 3-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA, wszystkie narządy aktywne metaboliczne (z wyjątkiem brunatnej tkanki tłuszczowej) oraz narządy limfatyczne większe były u matek z linii H-BMR (nerki: $F_{1,130} = 87,56$; $P < 0,0001$; jelito cienkie: $F_{1,134} = 55,89$; $P < 0,0001$; serce: $F_{1,130} = 35,08$; $P < 0,0001$; wątroba: $F_{1,129} = 32,33$; $P < 0,0001$; brunatna tkanka tłuszczowa: $F_{1,132} = 94,78$; $P < 0,0001$; grasica: $F_{1,125} = 5,48$; $P = 0,02$; śledziona: $F_{1,122} = 62,72$; $P < 0,0001$; węzły chłonne: $F_{1,127} = 19,28$; $P < 0,0001$; Tabela 9).

Niezależnie od efektu przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycja matek do wysokiej temperatury otoczenia skutkowała redukcją masy wątroby ($F_{1,129} = 12,15$; $P = 0,0006$), serca ($F_{1,130} = 20,34$; $P < 0,0001$), nerek ($F_{1,130} = 49,54$; $P < 0,0001$) oraz jelita cienkiego ($F_{1,134} = 11,57$; $P = 0,0009$; Tabela 9). W przypadku brunatnej tkanki tłuszczowej oraz grasicy, masa tych narządów była większa w 30°C niż w 23°C ($F_{1,132} = 4,72$; $P = 0,03$ oraz $F_{1,125} = 6,42$; $P = 0,01$; Tabela 9). Istotna interakcja linia selekcyjna $\times$ temperatura otoczenia pokazała, że największą masę grasicy miały matki z linii H-BMR w temperaturze 23°C ($F_{1,125} = 6,43$; $P = 0,01$), ale masa brunatnej tkanki tłuszczowej większa była u matek z niskim BMR w temperaturze 30°C ($F_{1,132} = 4,30$; $P = 0,04$). Masa narządów wewnętrznych nie zależała od immunizacji antygenem KLH ($P > 0,4$ we wszystkich przypadkach; Tabela 8).

2-czynnikowa analiza wariancji ANCOVA wykonana w temperaturze 23°C i 30°C, potwierdziła istotny wpływ przynależności do linii selekcyjnej na masę wszystkich narządów wewnętrznych ($P < 0,001$ we wszystkich przypadkach), z wyjątkiem masy grasicy w 30°C ($F_{1,59} = 0,28$; $P = 0,6$; Rycina 37B). Masa brunatnej tkanki tłuszczowej, w odróżnieniu od pozostałych narządów, była większa u matek z linii L-BMR w obu temperaturach (Rycina 38). Immunizacja antygenem KLH nie miała wpływu na masę narządów wewnętrznych w obu temperaturach ($P > 0,1$ we wszystkich przypadkach), interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja także nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($P > 0,07$ we wszystkich przypadkach).

4.3. Dyskusja

Wyniki pokazały, że w temperaturze 23°C matki z linii H-BMR były cięższe niż samice z linii o niskim BMR (Rycina 27A). Większa masa ciała samic z linii H-BMR korespondowała z wyższą konsumpcją pokarmu w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR (Rycina 30A), ale efektywność trawienia pokarmu była taka sama w obu liniach selekcyjnych (Rycina 31A). Matki z wysokim BMR asymilowały więcej energii z pokarmu w szczycie laktacji oraz produkowały bardziej kaloryczne mleko niż matki z niskim tempem metabolizmu (Rycina 32A i 34A), przy czym ich dzienne wydatki energetyczne były wyższe w grupie matek immunizowanych antygenem KLH (interakcja linia selekcyjna $\times$ immunizacja; Rycina 33A). Mimo wyższej kaloryczności mleka produkowanego przez matki z linii H-BMR w szczycie laktacji, ich mioty nie były

cięższe niż mioty matek z linii o niskim BMR w tym okresie ($F_{1,63} = 0,08$; $P = 0,8$; Rycina 35A). Obserwowany wysoki poziom DEE u immunizowanych matek z linii H-BMR także nie korespondował z wyższym poziomem przeciwciał anti-KLH IgM w surowicy matek (Rycina 33A i 36A). W ostatnim dniu laktacji samice z przeciwnych linii selekcyjnych nie różniły się poziomem odpowiedzi immunologicznej (Rycina 36A; Tabela 8).

W temperaturze 30°C matki z linii o wysokim BMR miały wyższą masę ciała w porównaniu do ich odpowiedniczek z linii L-BMR (Rycina 27B). Ekspozycja matek do temperatury 30°C obniżyła konsumpcję pokarmu, przy czym nadal więcej jadły matki z linii H-BMR (Rycina 30B; Tabela 7). Strawność pokarmu była lepsza w porównaniu do temperatury 23°C, nadal to matki z linii L-BMR lepiej radziły sobie z trawieniem pokarmu w porównaniu do matek z wysokim BMR (Rycina 31B; Tabela 7). Ekspozycja matek do temperatury 30°C obniżyła asymilację energii z pokarmu oraz dzienne wydatki energetyczne w porównaniu do wartości obserwowanych w 23°C (Rycina 32B i 33B; Tabela 8). W szczycie laktacji nadal lepiej asymilowały energię matki z wysokim BMR niż ich odpowiedniczki z linii L-BMR i tak, jak w 23°C, poziom DEE w tym okresie był taki sam u matek z obu linii selekcyjnych. Podobnie jak w 23°C, samice z wysokim BMR produkowały mleko o wyższej kaloryczności, przy czym poziom MEO był taki sam w obu temperaturach (Rycina 34B; Tabela 8). Mioty matek przyrastały szybciej w 30°C niż w warunkach kontrolnych (Tabela 7), jednak przyrost masy miotów, podobnie jak w 23°C, nie zależał od przynależności do linii selekcyjnej (Rycina 35B). Matki z przeciwnych linii selekcyjnych nie różniły się także poziomem przeciwciał anti-KLH IgM (Rycina 36B) w ostatnim dniu laktacji.

Wydaje się, że w obu temperaturach matki z obu linii selekcyjnych dały priorytet tylko opiece nad potomstwem. Tempo przyrostu masy miotów, szybsze w temperaturze 30°C, było jednak takie same u matek z linii H-BMR i L-BMR. Co więcej, w obu temperaturach otoczenia, mioty matek golonych z obu linii selekcyjnych (Eksperyment 3), przyrastały w takim samym tempie jak mioty matek niepozdebawionych sierści, opisane w Eksperymentie 2 (interakcja linia x golenie: $F_{1,113} = 2,97$; $P = 0,08$ dla 23°C oraz $F_{1,107} = 1,70$; $P = 0,2$ dla 30°C). W szczycie laktacji (między 12 a 14 dniem) dzienne wydatki energetyczne matek z przeciwnych linii selekcyjnych także nie różniły się między sobą. Nieznacznie większy poziom DEE u matek immunizowanych z linii H-BMR w 23°C, nie znalazł odzwierciedlenia w poziomie przeciwciał anti-KLH IgM.

W ostatnim dniu laktacji u matek z linii H-BMR w 23°C obserwowałam wzrost masy grasicy. Jak już wspomniałam w poprzednim Rozdziale (Podrozdział 3.3), może być to sygnał wczesnego etapu budowania reakcji obronnej, związany z intensywnym napływem prekursorów limfocytów T ze szpiku kostnego do grasicy, które po jej opuszczeniu powinny stymulować limfocyty B do produkcji przeciwciał anti-KLH IgM (Thapa i Farber 2019). Ekspozycja matek do temperatury 30°C spowodowała redukcję masy nerek, serca, jelita cienkiego oraz wątroby, w takim samym stopniu w obrębie obu linii selekcyjnych. Co ciekawe, w Eksperymentcie 2 (opisanym w Rozdziale 3), po ekspozycji niegolonych matek do 30°C zaobserwowałam jedynie spadek masy nerek i wątroby. W związku z tym, że redukcja masy kosztownych energetycznie narządów wiąże się z ograniczeniem ilości produkowanego przez nie ciepła metabolicznego (Schmidt-Nielsen 1997), wynik ten sugeruje, że golenie nie uwalniało matek od obciążenia związanego z wychowywaniem potomstwa i zastosowaniem immunizacji. Ponadto, u samic z niskim BMR umieszczonych w 30°C nastąpił wzrost masy brunatnej tkanki tłuszczowej (IBAT). Podobny efekt zaobserwowano w eksperymencie, w którym samce z tego samego modelu badawczego były poddane ekspozycji do temperatury 34°C (Książek i Konarzewski 2016). Główna funkcja IBAT związana jest z przeprowadzaniem procesów termogenezy bezdrzeniowej, zachodzącej z wykorzystaniem białka rozprzegającego UCP1 (Cannon i Nedergaard 2004). Zatem wzrost masy brunatnej tkanki tłuszczowej w wysokiej temperaturze otoczenia nie koresponduje ze zwiększonymi trudnościami w rozpraszaniu metabolicznego ciepła. W innych pracach, w których oceniano efekt działania wysokiej temperatury otoczenia na masę i parametry funkcjonalne IBAT u niegolonych zwierząt wykazano, że chomiki syryjskie poddane ekspozycji do 30°C redukowały masę IBAT w porównaniu do warunków kontrolnych (Garton i in. 1994), natomiast u myszokoczków mongolskich (Yang i in. 2013a) i myszy laboratoryjnych (Zhao i in. 2016) warunki otoczenia nie miały wpływu na zmiany masy brunatnej tkanki tłuszczowej.

W 23°C wyższą temperaturę ciała miały matki z linii L-BMR (Rycina 28A). Wynik ten nie korespondował jednak z szybszym przyrostem miotów tych matek w porównaniu do matek z linii H-BMR, nie był też odzwierciedleniem rozwoju odpowiedzi immunologicznej w warunkach kontrolnych. W temperaturze 23°C zaobserwowałam też pozytywną korelację między masą wychowywanego miotu a temperaturą ciała

matek (Rycina 29A), przy czym to matki z linii H-BMR, wychowujące najcięższe mioty miały najwyższą temperaturę ciała. Obserwacja ta nie wiązała się jednak z międzyliniowymi różnicami w tempie przyrostu masy miotów w Eksperyment 3. Zatem wzrost temperatury ciała u matek z wysokim BMR, wychowujących mioty o dużej masie jest manifestacją ich intensywnego wysiłku rodzicielskiego. Ponadto, w 23°C matki z linii H-BMR miały większe grasice niż ich odpowiedniczki z niskim BMR, a po immunizacji najbardziej zwiększyły swoje dzienne wydatki energetyczne (interakcja linia selekcyjna x immunizacja; Rycina 33A oraz 37A). Wyniki sugerują, że pozbawione sierści matki z linii H-BMR dały priorytet reprodukcji, przesuwając budowanie odpowiedzi immunologicznej na czas usamodzielnienia się potomstwa. Z kolei u matek w 30°C w obu liniach selekcyjnych przyrosty masy miotów były większe niż w 23°C, jednak nie przekładało się to na międzyliniowe różnice w temperaturze ciała, jak również w poziomie produkcji przeciwciał anty-KLH. Ponadto, mioty golonych matek z obu linii selekcyjnych (Eksperyment 3) przyrastały w obu temperaturach w takim samym tempie jak mioty niegolonych matek z linii L-BMR i H-BMR w Eksperyment 2. Rezultaty te sugerują, że usunięcie sierści podczas realizacji dwóch energochłonnych czynności, ułatwiając matkom rozpraszanie ciepła, być może nakłada na nie jednocześnie dodatkowe koszty termoregulacji, związane z koniecznością utrzymania stałej temperatury ciała.

Zgodnie z moim przewidywaniami, golone matki z linii L-BMR w obu temperaturach otoczenia dały priorytet wyłącznie reprodukcji. Inaczej niż zakładałam, ich mioty przyrastały w podobnym tempie jak mioty matek niegolonych z tej samej linii (Eksperyment 2). Przeciwnie do moich założeń, matki z linii H-BMR w obu temperaturach otoczenia nie uruchomiły reakcji obronnej, ale tempo przyrostu ich miotów rzeczywiście okazało się podobne do tempa przyrostu miotów matek niegolonych z wysokim BMR, opisanych w Eksperyment 2. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że zastosowanie golenia nie ułatwiło laktującym i jednocześnie immunizowanym matkom rozpraszania ciepła w takim stopniu, jak się spodziewałam. Wbrew moim oczekiwaniom, usunięcie matkom warstwy izolacyjnej nie umożliwiło im realizacji dwóch kosztownych energetycznie funkcji. Zebrane dane nie dostarczają poparcia dla założeń hipotezy HDL.

4.4. Tabele i ryciny

Tabela 7. Wyniki 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA dla układów w powtórzonych pomiarach z przynależnością do linii selekcyjnej, ekspozycją do temperatury 30°C i immunizacją antygenem KLH jako zmiennymi niezależnymi oraz wpływem czasu trwania eksperymentu na zmiany masy ciała, temperatury ciała, konsumpcji i strawności pokarmu oraz tempa przyrostu masy młodych u gotowych laktujących samic myszy laboratoryjnych (masa młodych jako zmienna ciągła w analizie różnic w temperaturze ciała oraz liczba młodych w miocie jako zmienna ciągła w analizie różnic w konsumpcji pokarmu i przyroście masy młodych).

	zmienne zależne									
	masa ciała		temperatura ciała		konsumpcja pokarmu		strawność pokarmu		tempo przyrostu masy młodych	
	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P	F _{d.f}	P
linia	49,89 _{1,127}	<0,0001 (+)	13,09 _{1,52}	0,0007 (-)	30,54 _{1,122}	<0,0001 (+)	13,35 _{1,121}	0,0004 (-)	1,03 _{1,115}	0,3
temperatura	1,05 _{1,127}	0,3	72,14 _{1,52}	<0,0001 (+)	100,18 _{1,122}	<0,0001 (+)	50,47 _{1,121}	<0,0001 (-)	21,86 _{1,115}	<0,0001 (-)
immunizacja	0,19 _{1,127}	0,7	0,20 _{1,52}	0,7	0,51 _{1,122}	0,5	0,03 _{1,121}	0,9	0,08 _{1,115}	0,8
linia x temperatura	0,31 _{1,127}	0,6	6,13 _{1,52}	0,02	0,02 _{1,122}	0,9	0,43 _{1,121}	0,5	0,09 _{1,115}	0,8
linia x immunizacja	0,23 _{1,127}	0,6	2,95 _{1,52}	0,09	0,66 _{1,122}	0,4	0,69 _{1,121}	0,4	2,66 _{1,115}	0,1
immunizacja x temperatura	6,72 _{1,127}	0,01	3,27 _{1,52}	0,08	0,48 _{1,122}	0,5	1,43 _{1,121}	0,2	1,05 _{1,115}	0,3
czas	19,99 _{6,762}	<0,0001	2,59 _{6,330}	0,02	12,17 _{5,610}	<0,0001	143,00 _{5,605}	<0,0001	0,38 _{5,575}	0,9
czas x linia	5,59 _{6,762}	<0,0001	0,34 _{6,330}	0,9	0,82 _{5,610}	0,5	3,0 _{5,605}	0,01	1,34 _{5,575}	0,2
czas x temperatura	2,50 _{6,762}	0,02	2,39 _{6,330}	0,03	2,99 _{5,610}	0,01	3,5 _{5,605}	0,004	1,03 _{5,575}	0,4
czas x immunizacja	0,15 _{6,762}	0,9	0,11 _{6,330}	0,9	0,27 _{5,610}	0,9	1,7 _{5,605}	0,1	0,66 _{5,575}	0,6

Wartość $P \leq 0,05$ oznaczona jest pogrubioną czcionką.

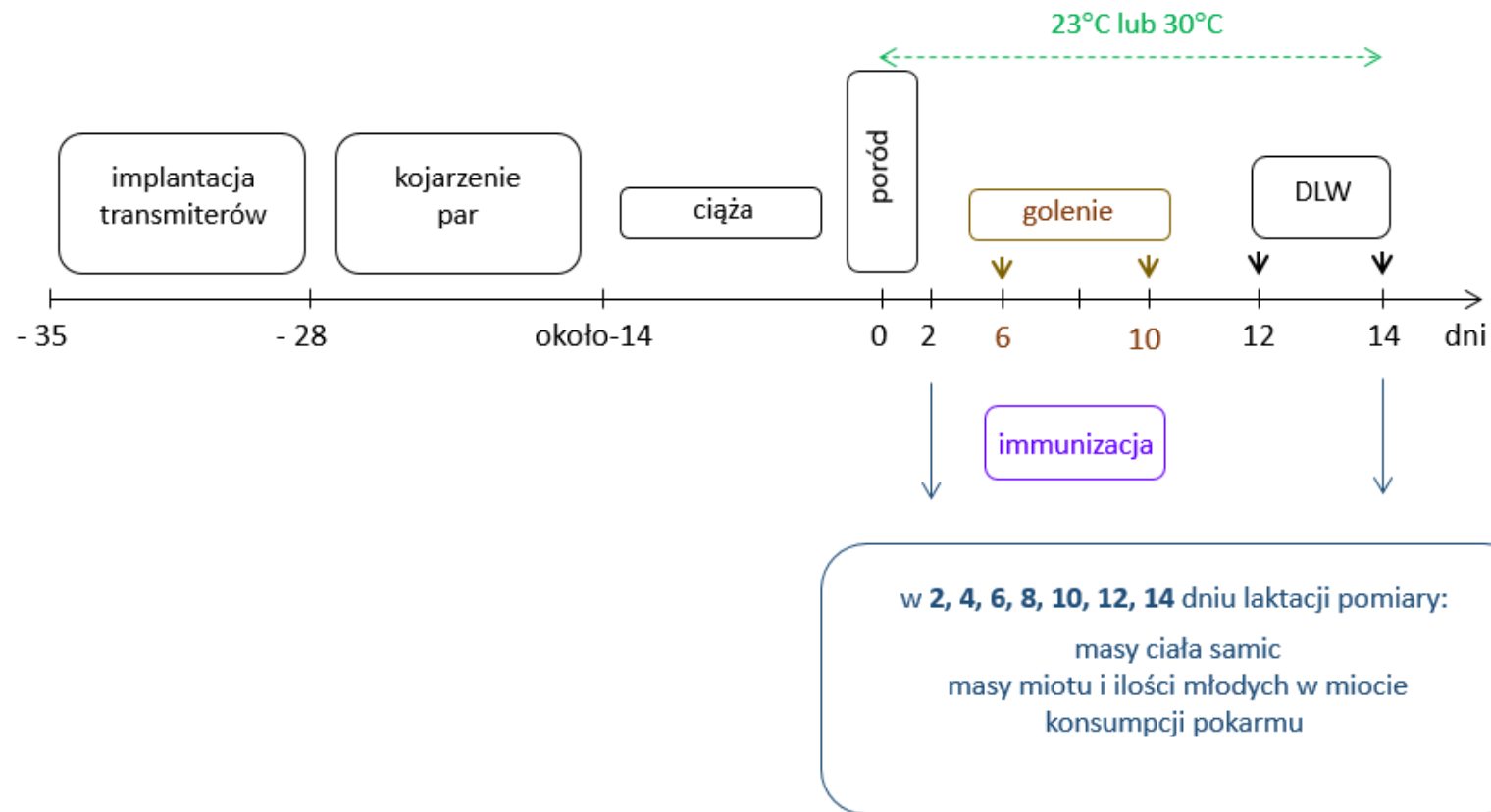
Znak (+) przy wartości P oznacza: H-BMR > L-BMR i 23°C > 30°C; natomiast znak (-) oznacza: L-BMR > H-BMR i 30°C > 23°C.

Tabela 8. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz immunizacji antygenem KLH na codzienne spożycie energii (DEI; *Daily Energy Intake*), ilość energii brutto pobieranej z pokarmu (GEI; *Gross Energy Intake*), zawartość energii w odchodach (GE_{feaces}; *Gross Energy of feaces*), ilość energii asymilowanej z pokarmu (MEI; *Metabolisable Energy Intake*), codzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*), kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) oraz poziom przeciwciał anty-KLH IgM u gołonych laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA/ANCOVA ± SE (błąd standardowy) i korygowane o przyrost masy miotów między 12 a 14 dniem laktacji (z wyjątkiem poziomu przeciwciał anty-KLH IgM).

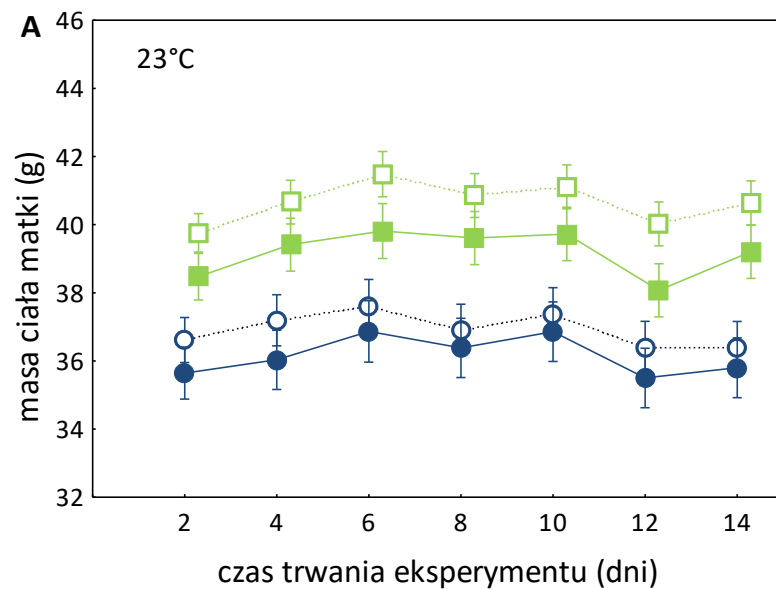
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	KLH	PBS
DEI	190,48 ± 4,03	162,16 ± 4,58	187,42 ± 4,89	166,53 ± 4,21	179,76 ± 4,67	174,27 ± 4,93
GEI	246,64 ± 5,50	205,20 ± 6,91	244,16 ± 6,80	209,54 ± 6,14	231,49 ± 6,41	222,05 ± 7,34
GE _{feaces}	55,41 ± 1,80	45,29 ± 1,99	56,74 ± 2,07	44,75 ± 1,58	51,73 ± 1,86	49,52 ± 2,16
MEI	183,33 ± 4,01	160,847 ± 3,73	184,42 ± 4,15	162,21 ± 3,68	173,41 ± 4,36	172,35 ± 4,30
DEE	107,63 ± 3,00	104,26 ± 3,08	115,29 ± 2,89	97,55 ± 2,46	105,75 ± 2,78	106,34 ± 3,27
MEO	75,71 ± 3,29	56,59 ± 2,40	69,13 ± 3,89	64,66 ± 2,76	67,66 ± 2,80	66,01 ± 3,75
anty-KLH IgM	0,31 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,02

Tabela 9. Wpływ przynależności do linii selekcyjnej, ekspozycji do temperatury 30°C oraz immunizacji antygenem KLH na masę narządów aktywnych metabolicznie i limfatycznych u golonych laktujących samic myszy laboratoryjnych. Wartości przedstawione w tabeli wyrażone są jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z 3-czynnikowej analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) i korygowane o masę matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę treści jelitowej i masę analizowanego narządu.

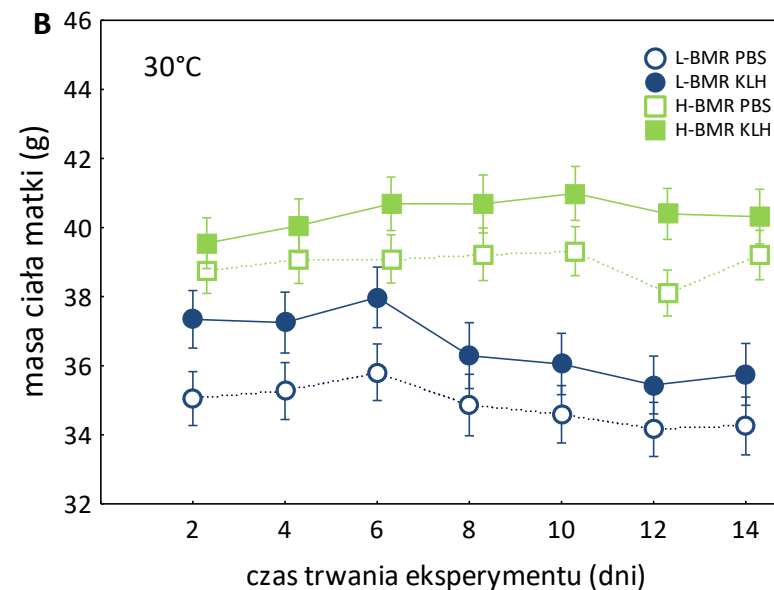
	zmienne niezależne					
	linia selekcyjna		temperatura otoczenia		manipulacja	
	H-BMR	L-BMR	23°C	30°C	KLH	PBS
nerki	0,501 $\pm$ 0,008	0,399 $\pm$ 0,006	0,489 $\pm$ 0,010	0,442 $\pm$ 0,011	0,472 $\pm$ 0,011	0,461 $\pm$ 0,010
jelito	2,497 $\pm$ 0,051	1,844 $\pm$ 0,047	2,314 $\pm$ 0,062	2,113 $\pm$ 0,061	2,209 $\pm$ 0,065	2,215 $\pm$ 0,061
serce	0,164 $\pm$ 0,002	0,140 $\pm$ 0,002	0,158 $\pm$ 0,002	0,149 $\pm$ 0,002	0,155 $\pm$ 0,002	0,152 $\pm$ 0,002
wątroba	2,183 $\pm$ 0,039	1,773 $\pm$ 0,028	2,067 $\pm$ 0,046	1,936 $\pm$ 0,038	2,016 $\pm$ 0,042	1,988 $\pm$ 0,043
IBAT	0,032 $\pm$ 0,001	0,054 $\pm$ 0,002	0,040 $\pm$ 0,002	0,044 $\pm$ 0,002	0,041 $\pm$ 0,002	0,043 $\pm$ 0,002
grasica	0,032 $\pm$ 0,001	0,024 $\pm$ 0,001	0,026 $\pm$ 0,001	0,031 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,001
śledziona	0,310 $\pm$ 0,013	0,147 $\pm$ 0,005	0,238 $\pm$ 0,015	0,247 $\pm$ 0,015	0,245 $\pm$ 0,017	0,241 $\pm$ 0,013
węzły chłonne	0,012 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001



Rycina 26. Schemat przebiegu Eksperymentu 3, w którym pozbawione sierści laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR poddane były ekspozycji do temperatury 30°C i immunizowane antygenem KLH. Opis ryciny znajduje się w tekście (Rozdział 4).

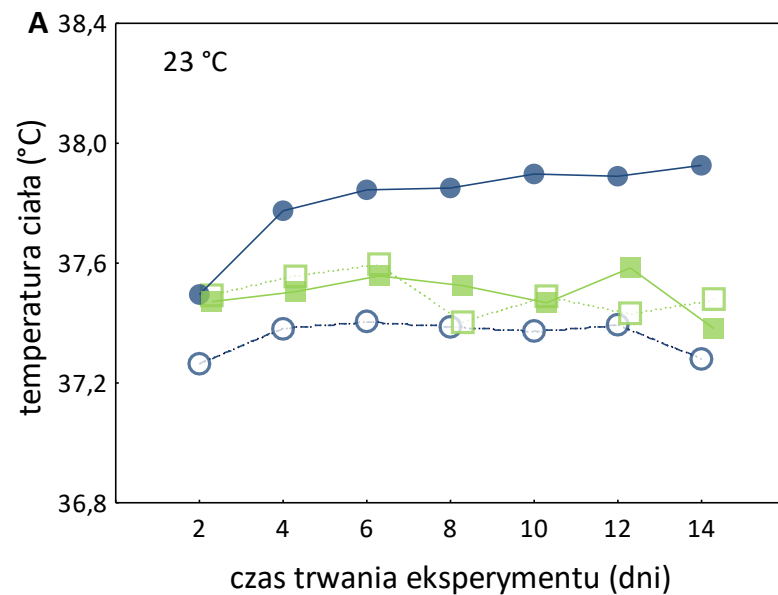


$P_{LINIA} < 0,0001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

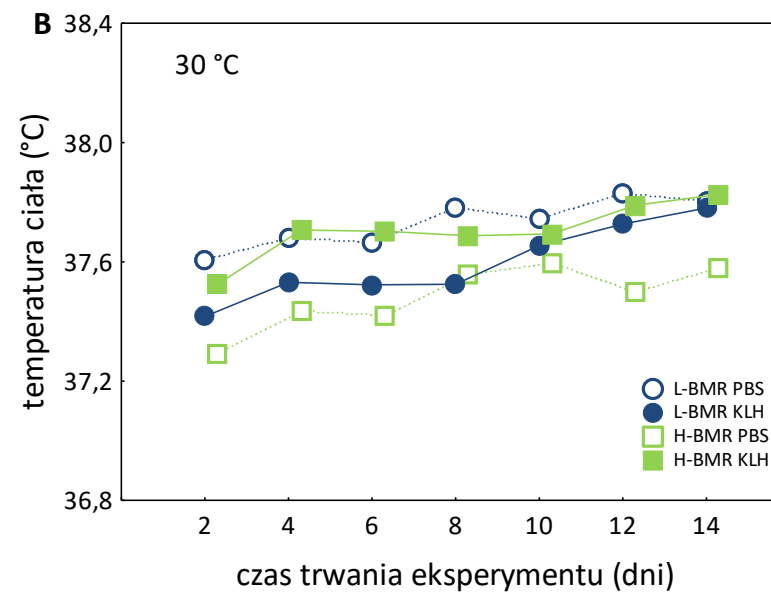


$P_{LINIA} < 0,0001$
 $P_{CZAS} < 0,0001$
 $P_{IMMUNIZACJA} = 0,04$
 $P_{CZAS * LINIA} < 0,0001$

Rycina 27. Zmiany masy ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C i immunizowanych antygenem KLH. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Zmiany masy ciała wyrażone są jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.

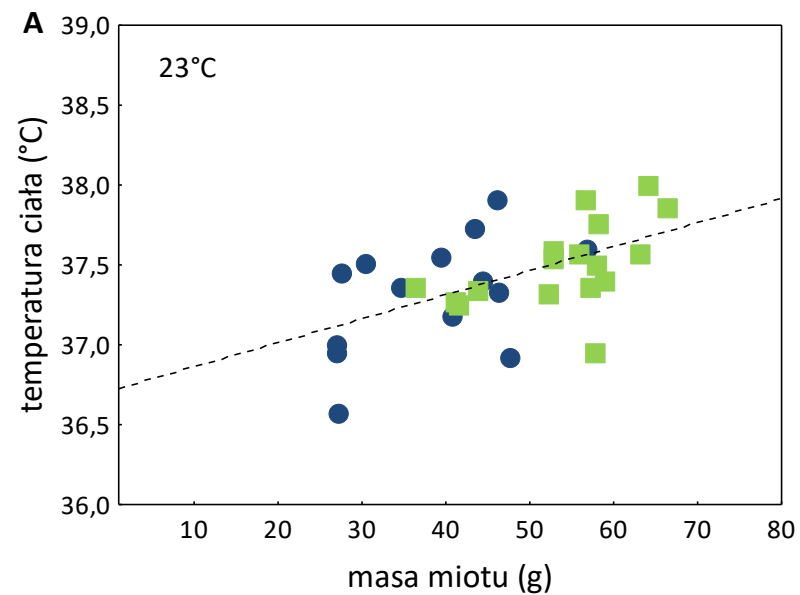


$P_{LINIA} = 0,0003$

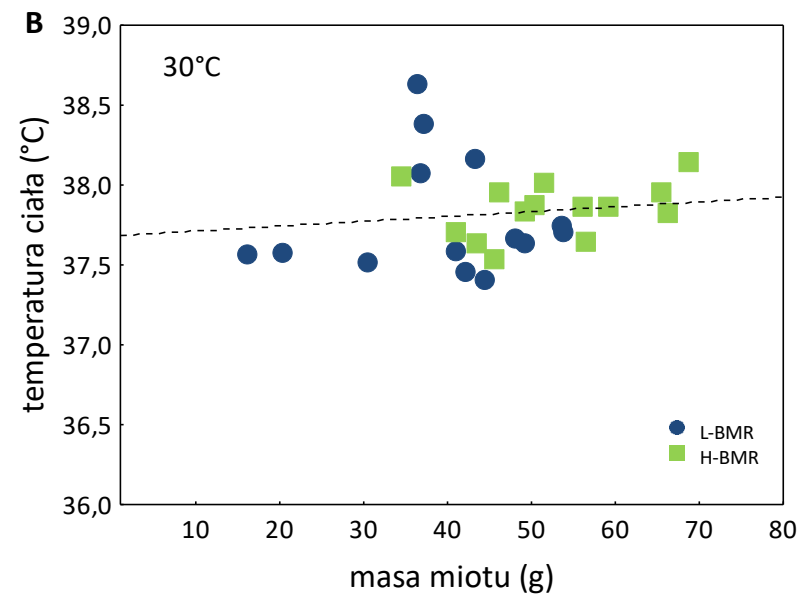


$P_{CZAS} = 0,001$

Rycina 28. Zmiany temperatury ciała laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Temperatura ciała wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o masę miotu).

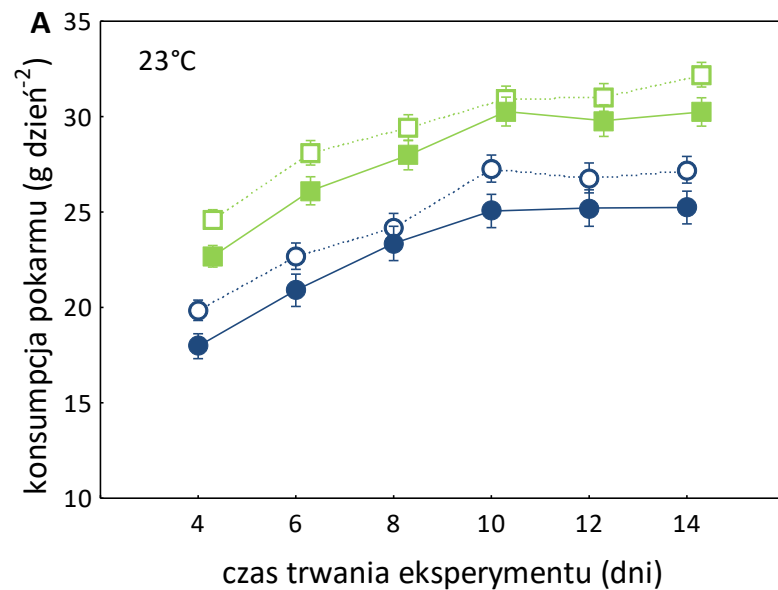


$P = 0,001$
 $r = 0,55$

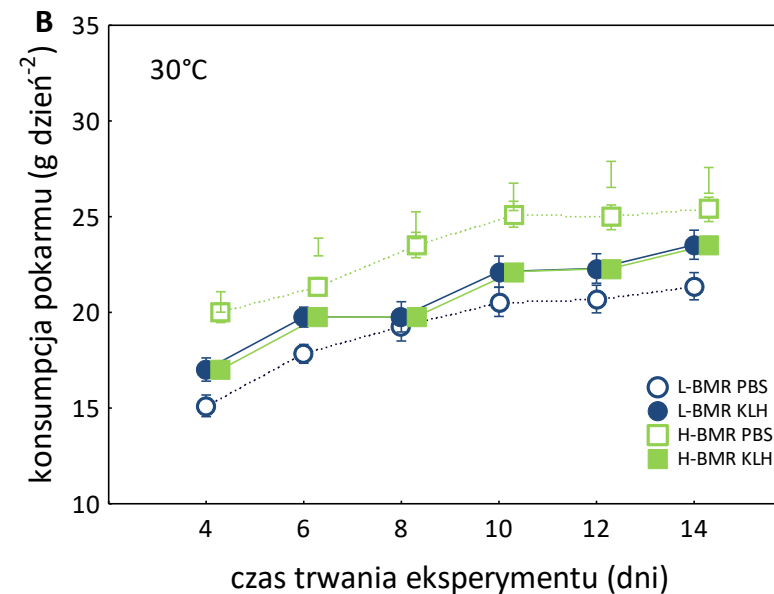


$P = 0,5$
 $r = 0,12$

Rycina 29. Korelacja między masą miotu a średnią temperaturą ciała obserwowana w 14 dniu laktacji u samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkie samice miały usuniętą warstwę izolacyjną w postaci sierści.

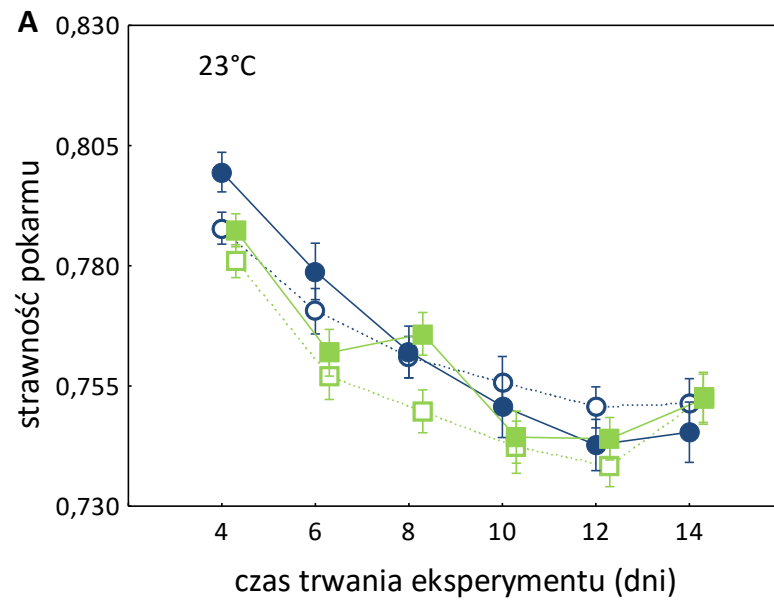


$P_{LINIA} = 0,002$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

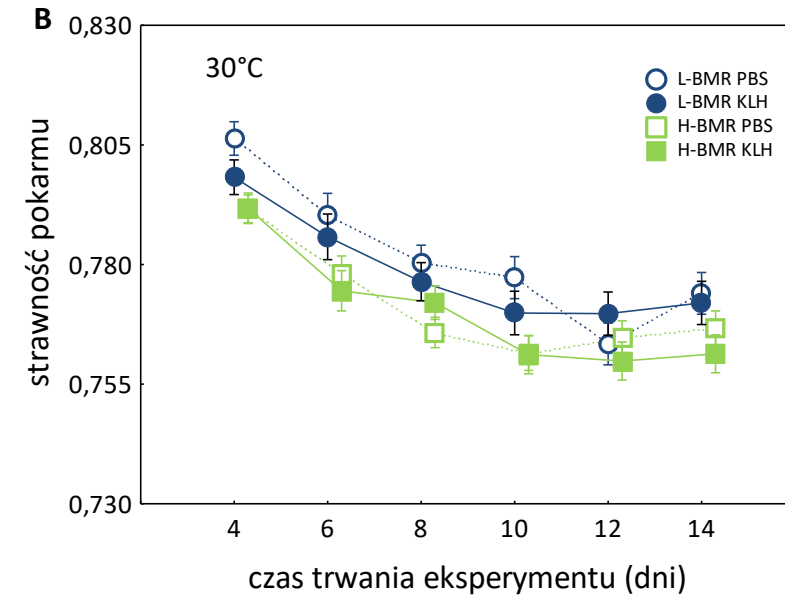


$P_{LINIA} < 0,0001$

Rycina 30. Zmiany w konsumpcji pokarmu laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Konsumpcja pokarmu wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).

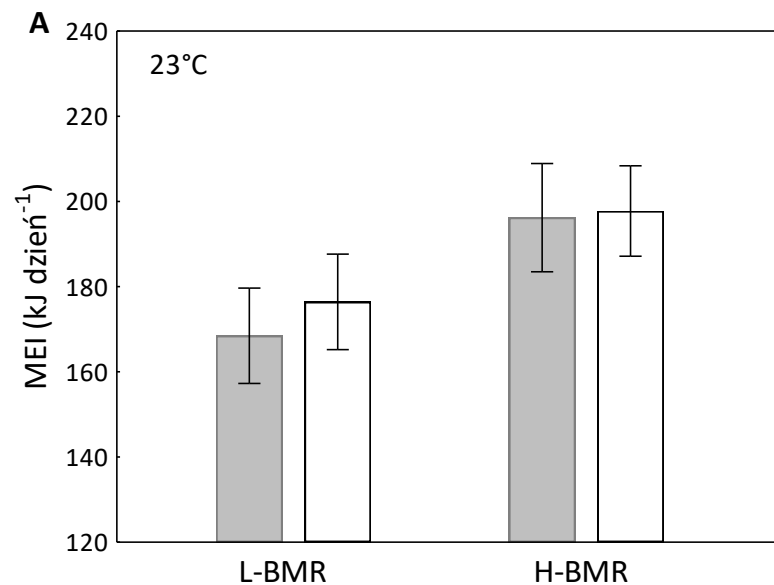


$P_{CZAS} < 0,0001$
 $P_{CZAS * LINIA} = 0,004$
 $P_{CZAS * IMMUNIZACJA} = 0,003$

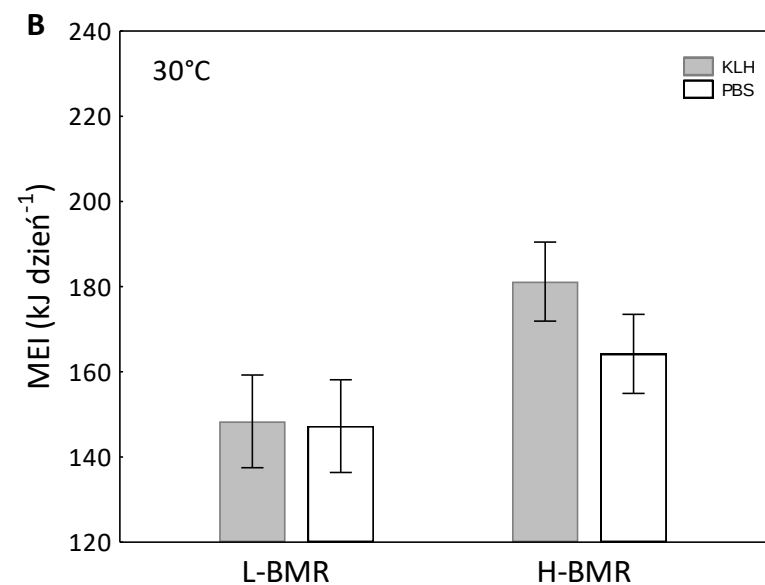


$P_{LINIA} = 0,0005$
 $P_{CZAS} < 0,0001$

Rycina 31. Zmiany strawności pokarmu u laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Strawność pokarmu wyrażona jest jako wartości absolutne z analizy wariancji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami.

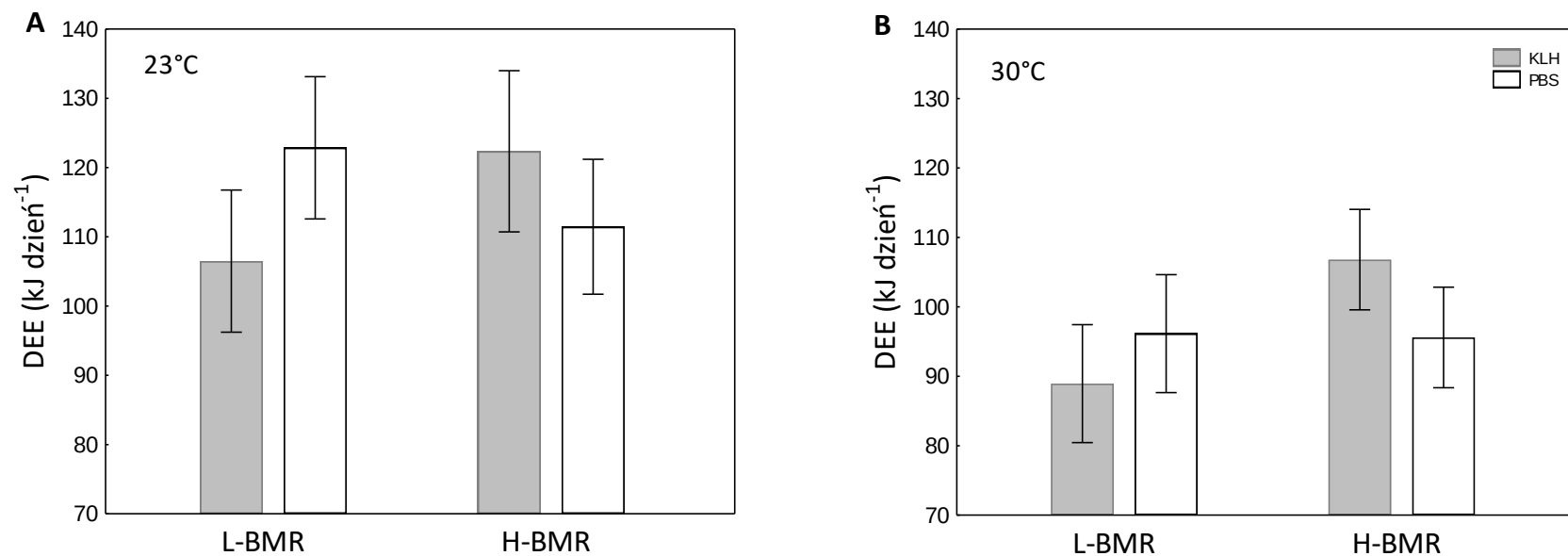


$P_{LINIA} = 0,009$



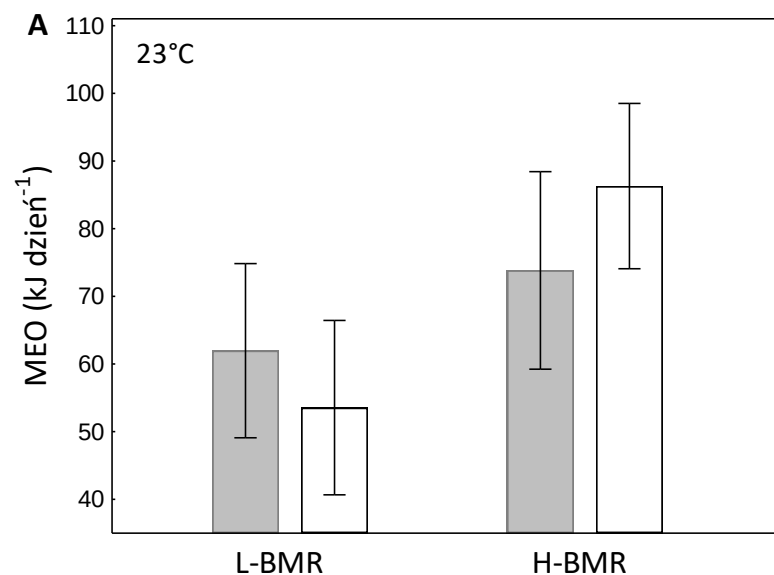
$P_{LINIA} = 0,0002$

Rycina 32. Wpływ immunizacji antygenem KLH na ilość energii metabolizowanej (MEI; *Metabolisable Energy Intake*) przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEI oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Wartość MEI wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariacji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

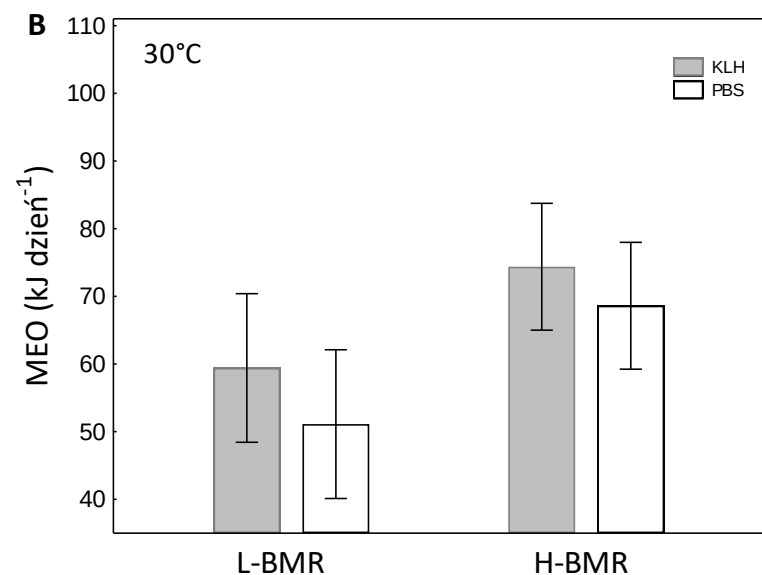


$P_{\text{LINIA} * \text{IMMUNIZACJA}} = 0,03$

Rycina 33. Wpływ immunizacji antygenem KLH na codzienne wydatki energetyczne (DEE; *Daily Energy Expenditure*) laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość DEE oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Wartość DEE wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.

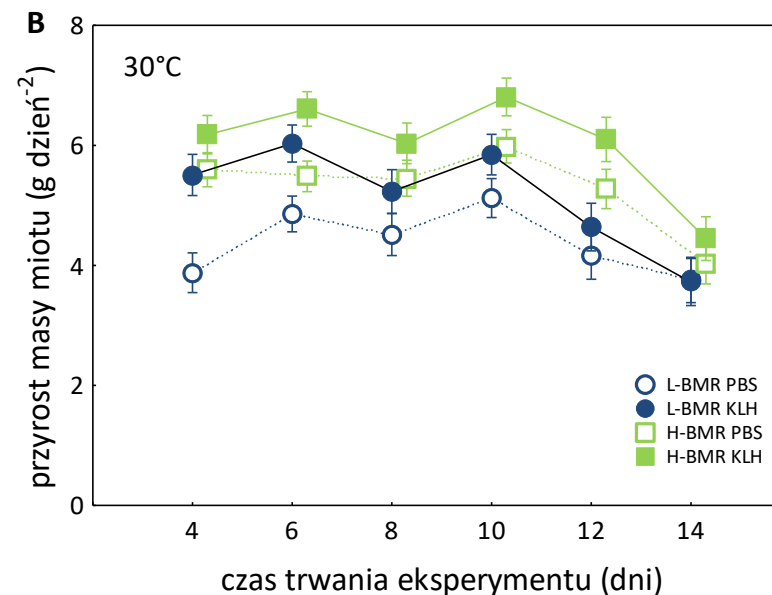
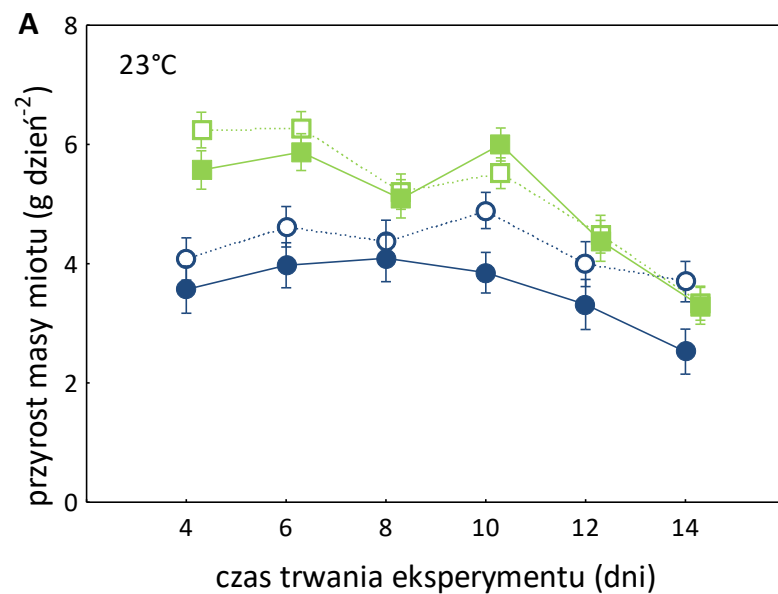


$P_{LINIA} = 0,01$

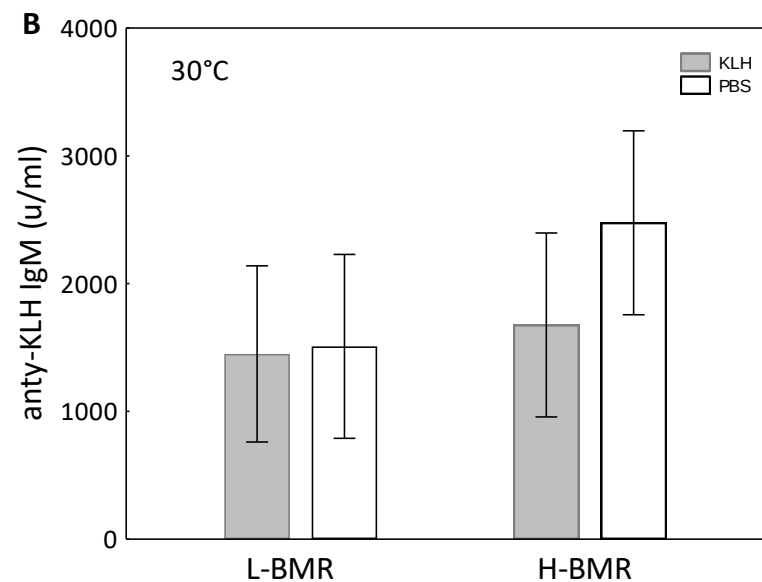
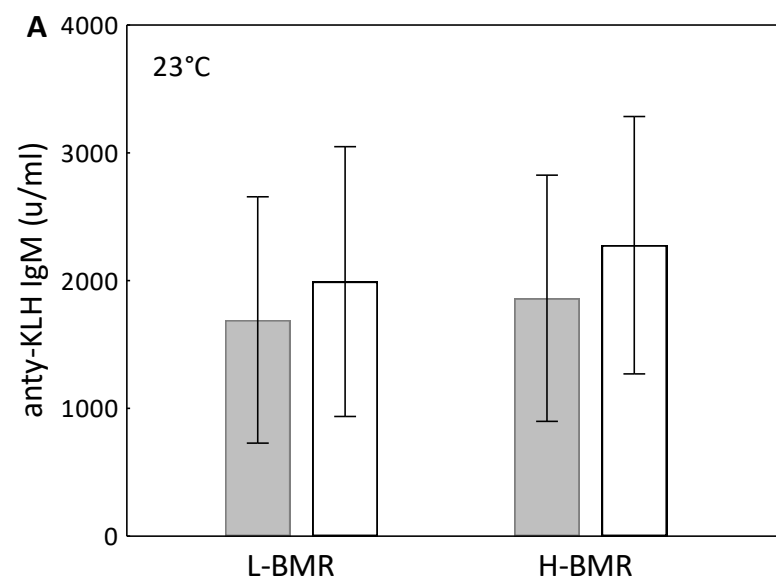


$P_{LINIA} = 0,003$

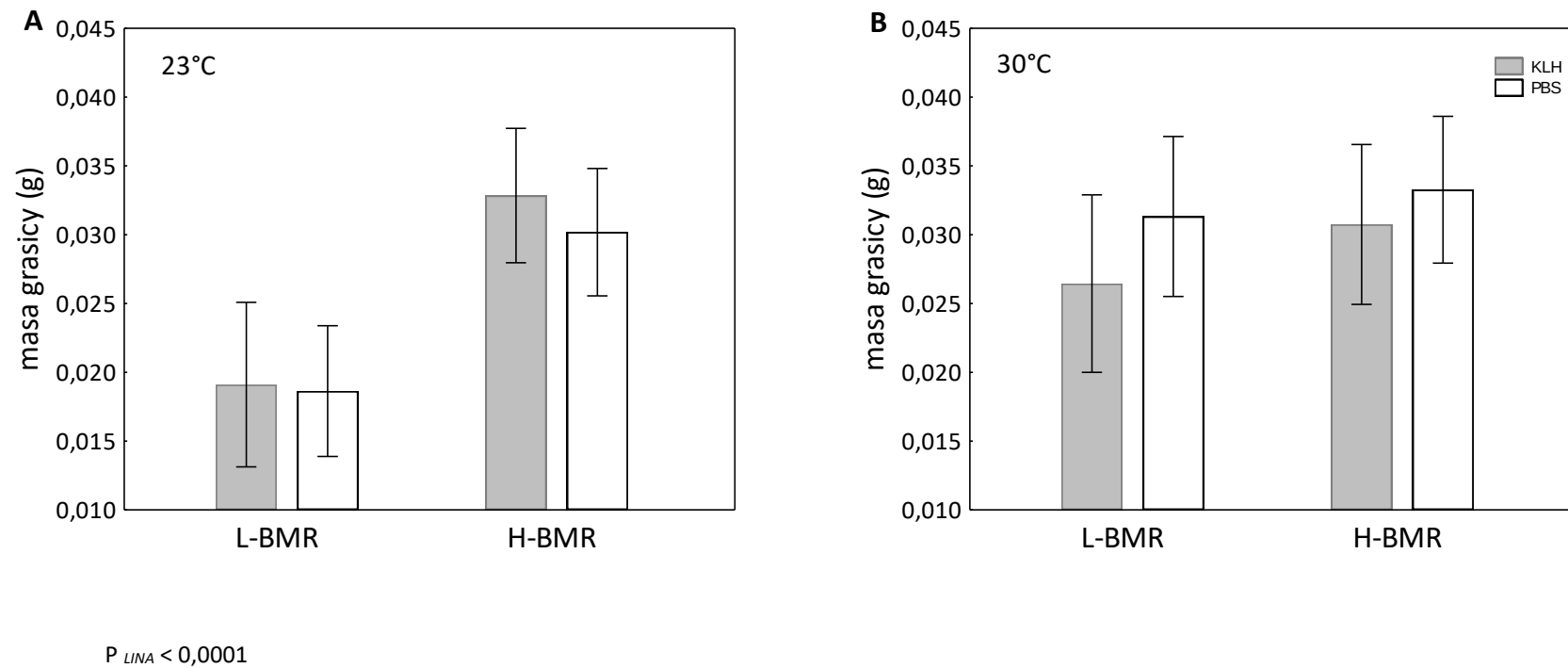
Rycina 34. Wpływ immunizacji antygenem KLH na kaloryczność mleka (MEO; *Milk Energy Output*) produkowanego przez laktujące samice myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wartość MEO oszacowano dla okresu między 12 a 14 dniem laktacji. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Wartość MEO wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o przyrost masy miotu między 12 a 14 dniem laktacji.



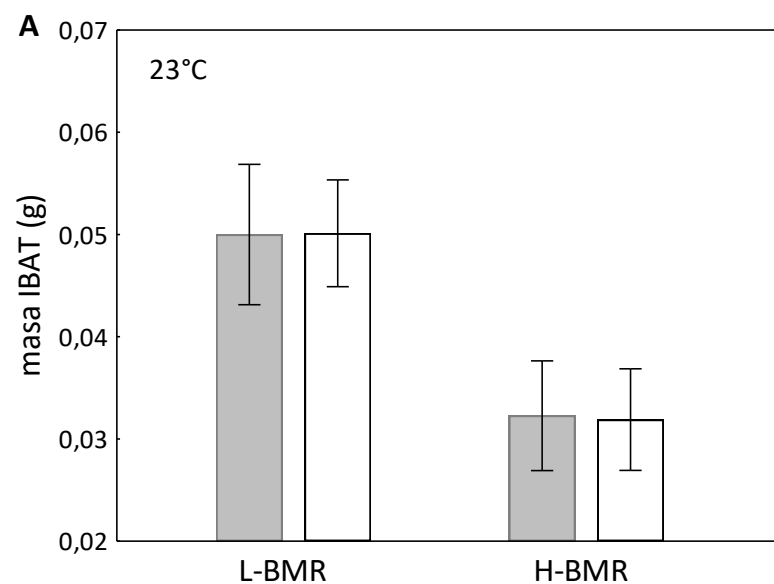
Rycina 35. Zmiany tempa przyrostu masy miotów laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Przyrost masy miotów wyrażony jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy) dla układów z powtórzonymi pomiarami (korygowane o liczbę młodych w miocie).



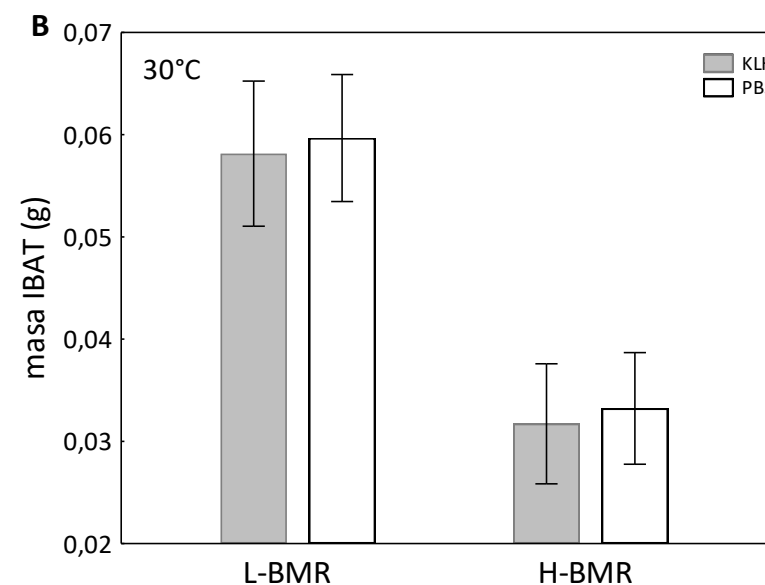
Rycina 36. Poziom przeciwciał anti-KLH u laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Poziom przeciwciał wyrażony jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariacji ANOVA $\pm$ SE (błąd standardowy).



Rycina 37. Wpływ immunizacji antygenem KLH na masę grasicy laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Masa grasicy wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę grasicy.



$P_{LINA} < 0,0001$



$P_{LINA} < 0,0001$

Rycina 38. Wpływ immunizacji antygenem KLH na masę brunatnej tkanki tłuszczowej laktujących samic myszy laboratoryjnych z linii L-BMR i H-BMR w temperaturze **(A)** 23°C oraz **(B)** 30°C. Wszystkim samicom usunięto warstwę izolacyjną w postaci sierści. Masa brunatnej tkanki tłuszczowej wyrażona jest jako średnie wartości najmniejszych kwadratów z analizy wariancji ANCOVA $\pm$ SE (błąd standardowy), korygowane o masę ciała matki w 14 dniu laktacji pomniejszoną o masę brunatnej tkanki tłuszczowej.

5. Dyskusja ogólna

Celem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej było testowanie założeń hipotezy o ograniczeniach w rozpraszaniu ciepła, przy czym w badaniach stworzyłam warunki do ujawniania się kompromisów energetycznych (*trade-offs*). Zakładałam, że jeśli budżety energetyczne laktujących samic są ograniczane przez ich zdolności do rozpraszania metabolicznego ciepła, jednoczesne obciążenie matek kosztami opieki rodzicielskiej i budowania odpowiedzi immunologicznej powinno doprowadzić do ujawniania się kompromisów pomiędzy tymi funkcjami. W badaniach wykorzystałam model zwierzęcy, jakim są samice myszy laboratoryjnych selekcionowane w kierunku niskiego (L-BMR) i wysokiego (H-BMR) tempa metabolizmu podstawowego. Model ten idealnie wpasowuje się w założenia hipotezy HDL, gdyż oprócz genetycznie uwarunkowanych różnic w tempie przetwarzania energii i produkcji ciepła, zwierzęta z przeciwnych linii selekcyjnych nie różnią się przewodnością cieplną (Gębczyński i in. 2005). Aby zweryfikować słuszność postawionych we Wstępie hipotez, przeprowadziłam trzy komplementarne eksperymenty różniące się między sobą zastosowanymi manipulacjami.

Eksperyment 1 (Rozdział 2; Rycina 1) opierał się na zastosowaniu procedury golenia sierści u laktujących samic przed szczytem laktacji. Spodziewałam się, że usunięcie warstwy izolacyjnej u matek poddanych ekspozycji do temperatury 30°C ułatwi im rozpraszanie metabolicznego ciepła, a w konsekwencji podniesie ich wysiłek rodzicielski w sposób zależny od indywidualnego tempa metabolizmu. Zgodnie z moimi założeniami, matki z przeciwnych linii selekcyjnych różniły się odpowiedzią na zastosowaną manipulację. Ekspozycja samic z linii H-BMR do 30°C ograniczyła ich wysiłek rodzicielski, jednak wpływ golenia na tempo przyrostu masy miotów matek z tej linii selekcyjnej istotny był jedynie w temperaturze 23°C (Rycina 10). Wbrew moim założeniom, mioty matek z linii o niskim BMR przyrastały szybciej w 30°C niż w warunkach kontrolnych. Co więcej, w temperaturze 30°C ich wysiłek reprodukcyjny był wyższy w porównaniu do matek z wysokim BMR, nawet bez efektu golenia.

Głównym założeniem Eksperymentu 2 (Rozdział 3; Rycina 12) była ocena reakcji matek na jednoczesne obciążenie ich budżetów energetycznych opieką rodzicielską i

rozwojem reakcji obronnej. Zakładałam, że u laktujących samic ujawnią się zależne od osobniczego tempa metabolizmu kompromisy między tymi funkcjami. Zgodnie z moimi przewidywaniami, matki z przeciwnych linii selekcyjnych inaczej radziły sobie z jednoczesną realizacją obu czynności. Inaczej, niż zakładałam, matki z linii L-BMR laktujące w obu temperaturach otoczenia dały priorytet wyłącznie reprodukcji, nie obserwowałam u nich wzrostu poziomu przeciwciał po podaniu antygeny KLH (Rycina 21 i 22). Ponadto, w 30°C ich mioty w szczycie laktacji (między 12 a 14 dniem) przyrastały szybciej niż mioty matek z linii H-BMR ($F_{1,46} = 7,69$; $P = 0,007$). Matki z wysokim BMR próbowały budować odpowiedź na podany antygen, ale ich reakcja rozwijała się zależnie od warunków otoczenia. W temperaturze 23°C, w ostatnim dniu laktacji, samice z tej linii uruchomiły już produkcję przeciwciał anty-KLH IgM (Rycina 22A), ich mioty w porównywalnym okresie przyrastały w takim samym tempie jak mioty matek z niskim tempem metabolizmu ($F_{1,55} = 3,67$; $P = 0,06$; Rycina 21A). Natomiast w temperaturze 30°C matki z wysokim BMR dały początkowo priorytet reprodukcji, przy czym w ostatnim dniu laktacji, kiedy tempo przyrostu masy ich miotów było wolniejsze (Rycina 21B), obserwowany wzrost masy grasicy i węzłów chłonnych (Rycina 24B i 25B) może sugerować ujawnianie się kompromisu między opieką rodzicielską a reakcją obronną.

Eksperyment 3 (Rozdział 4; Rycina 26) także testował okoliczności ujawniania się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną, ale matki z przeciwnych linii selekcyjnych pozbawione były warstwy izolacyjnej. Spodziewałam się, że eksperymentalne zniesienie limitów w rozpraszaniu ciepła ułatwi matkom realizację dwóch kosztownych funkcji fizjologicznych w stopniu większym niż w Eksperymencie 2. Wyniki pokazały jednak, że matki z przeciwnych linii selekcyjnych w obu temperaturach otoczenia dały priorytet wyłącznie reprodukcji, nie uruchamiając produkcji przeciwciał (Rycina 35 i 36). Przeciwnie do moich założeń, mioty matek golonych z obu linii selekcyjnych w Eksperymencie 3 nie przyrastały szybciej w porównaniu do miotów matek niegolonych z linii H-BMR i L-BMR w Eksperymencie 2 (interakcja linia selekcyjna x golenie: $F_{1,113} = 2,97$; $P = 0,08$ dla 23°C oraz $F_{1,107} = 1,70$; $P = 0,2$ dla 30°C).

Zebrane przeze mnie dane nie potwierdzają hipotezy 1 i 2 (postawionych we Wstępie rozprawy), tylko częściowo korespondują z założeniami hipotezy 3. Zgodnie z moimi przewidywaniami, reakcja matek na łączny efekt laktacji i stresu obronnego

zależna była przede wszystkim od osobniczego tempa metabolizmu podstawowego, jednak radziły sobie one w sposób odmienny niż zakładałam. Samice z niskim BMR dały priorytet wyłącznie reprodukcji, nie rozpoczynały produkcji swoistych przeciwciał, nie obserwowałam też zmian w narządach limfatycznych mogących świadczyć o początkowych etapach rozwoju reakcji obronnej w obu temperaturach otoczenia (Roitt 2000, Gołąb i in. 2004, Thapa i Farber 2019). Wynik ten jest zbieżny z rezultatami pracy Yang i współautorów (2013b), którzy testując ujawnianie się kompromisów między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną u myszokoczków mongolskich nie zaobserwowali zwiększonej produkcji specyficznych przeciwciał po immunizacji, jak również wzrostu masy narządów limfatycznych u matek laktujących zarówno w 21°C i 30°C. Jak pokazały moje wyniki, niepozbawione sierści matki z linii H-BMR (Eksperyment 2) były w stanie łączyć wychowywanie potomstwa z produkcją specyficznych przeciwciał (w szczycie laktacji). Podobny wynik dała praca, w której samice nornika Brandta, laktujące w 21°C, mimo obciążenia związanego z wychowywaniem potomstwa, nie stłumiły produkcji swoistych przeciwciał w odpowiedzi na immunizację antygenem KLH (Xu i in. 2012). Ponadto, matki z wysokim BMR laktujące w temperaturze 30°C (Eksperyment 2) dały priorytet reprodukcji, a kiedy młode stawały się trochę bardziej samodzielne (14 dzień laktacji) powiększały się ich narządy limfatyczne, co jak można przypuszczać, było wstępem do rozwoju reakcji obronnej.

We wszystkich trzech eksperymentach ekspozycja matek z obu linii selekcyjnych do temperatury 30°C skutkowała szybszym przyrostem masy miotów, w porównaniu do temperatury 23°C, jednak nie wiązała się z produkcją mleka o wyższej zawartości energii w szczycie laktacji. Wyniki ten nie pokrywa się z wynikami innych prac testujących założenia hipotezy HDL z wykorzystaniem tej samej manipulacji. Przykładowo, ekspozycja laktujących samic nornika zwyczajnego (Simons i in. 2011), chomika stepowego (Huang i in. 2020) oraz myszy laboratoryjnych szczepu Swiss (Zhao i in. 2016) i MF1 (Król i Speakman 2003b) do temperatury 30°C skutkowała niższą kalorycznością mleka oraz wychowywaniem mniejszych miotów w porównaniu do warunków kontrolnych. Z kolei umieszczenie samic chomika syryjskiego i nornika Brandta w temperaturze 30°C obniżyło kaloryczność produkowanego przez nie mleka,

jednak nie wywarło wpływu na tempo, w jakim przyrastały ich mioty (Wu i in. 2009, Ohrnberger i in 2018).

Jednoznacznego poparcia dla założeń hipotezy HDL nie dostarczyło także zastosowanie procedury usuwania sierści laktującym samicom. Zgodnie z wynikami innych prac, w których także stosowano tę manipulację (Król i in. 2007, Sadowska i in. 2016, Ohrnberger i in. 2020), golenie matek z linii H-BMR (Eksperyment 1) umożliwiło im wychowywanie większych miotów w porównaniu do matek niegolonych w temperaturze 23°C. Z kolei przeciwnie do założeń hipotezy HDL, matki z linii L-BMR poddane procedurze golenia w tej samej temperaturze w Eksperyment 1, nie podnosiły swojego wysiłku rodzicielskiego w porównaniu do matek niegolonych. Ponadto, niezgodnie z założeniami hipotezy HDL, usunięcie sierści matkom z linii H-BMR i L-BMR, których budżety energetyczne zostały obciążone kosztami reprodukcji i budowania odpowiedzi immunologicznej (Eksperyment 3), nie ułatwiło im jednoczesnej realizacji obu kosztownych energetycznie funkcji.

Uzyskane wyniki sugerują, że usunięcie warstwy izolacyjnej matkom z linii L-BMR, wychowującym młode w temperaturze 23°C nakładało na nie dodatkowe koszty termoregulacji, związane z koniecznością utrzymania stałej temperatury ciała. Efekt ten był szczególnie zauważalny u samic z niskim BMR w Eksperyment 1, których mioty w warunkach kontrolnych przyrastały słabiej niż mioty ich odpowiedniczek z wysokim BMR (Rycina 10A). Obserwację tę tłumaczyć mogą wyniki ostatnich badań prowadzonych na tym samym modelu zwierzęcym. Jak się okazuje, myszy z różnym BMR mogą różnić się najniższą temperaturą krytyczną (ang. *Lower Critical Temperature*; LCT), determinującą dolną granicę strefy termoneutralnej zwierząt. O ile w przypadku linii H-BMR temperatura 23°C mieści się w granicach strefy termoneutralnej, myszy z linii L-BMR mają LCT niższą o około 9°C (Gębczyński; dane nieopublikowane). Obserwacja ta jest dodatkowo poparta wynikami badań Sadowskiej i współautorów (2019), gdzie wykazano, że golone matki z linii L-BMR wychowywały najmniejsze mioty w porównaniu do matek niegolonych z obu linii selekcyjnych oraz golonych matek z wysokim BMR w temperaturze 23°C.

We wszystkich trzech eksperymentach obserwowałam pozytywną korelację między masą wychowywanego przez matki miotu a ich temperaturą ciała. W dwóch pierwszych doświadczeniach efekt ten dotyczył matek laktujących w 30°C, przy czym w

Eksperymencie 1 najwyższą temperaturę ciała miały matki z linii L-BMR, a w Eksperymencie 2 matki z linii H-BMR, wychowujące w tych temperaturach największe mioty (Rycina 4B i 15B). Natomiast w Eksperymencie 3 wyższa temperatura ciała obserwowana była u matek z linii H-BMR, wychowujących mioty o największej masie w warunkach kontrolnych (Rycina 29A). Obserwacja ta może być istotna w kontekście zachodzących obecnie zmian klimatycznych. Zgodnie z danymi przedstawionymi w raporcie IPCC z 2022 roku, dotychczasowy średni wzrost globalnej temperatury otoczenia obserwowany jest na poziomie około 1,1°C. Stale rosnąca temperatura otoczenia pociąga za sobą zwiększone ryzyko występowania niekontrolowanych zjawisk atmosferycznych, wśród których szczególną rolę odgrywają ekstremalne upały. Zgodnie z założeniami hipotezy HDL, wzrost temperatury otoczenia, może utrudniać zwierzętom rozpraszanie ciepła i nakładać na nie fizjologiczne ograniczenia, redukujące poziom opieki rodzicielskiej. Zatem w obliczu zmian, związanych z ocieplaniem się klimatu, obserwowana w moich badaniach podwyższona temperatura ciała matek wychowujących duże mioty może prowadzić do zmian w geograficznym rozmieszczeniu gatunków, ale także do zwiększonej śmiertelności, co już zostało potwierdzone w przypadku niektórych gatunków zwierząt (Thomas i in. 2004, Levinsky i in. 2007, Welbergen i in. 2007, Deng i in. 2020, Montesana i Hau 2022).

Podsumowując, laktujące samice myszy laboratoryjnych różniące się BMR inaczej radziły sobie z trudnościami związanymi z obciążeniem ich budżetów energetycznych kosztami opieki rodzicielskiej i rozwoju reakcji obronnej. Matki charakteryzujące się niskim BMR dawały priorytet wyłącznie reprodukcji, odkładając budowanie odpowiedzi immunologicznej w czasie. Mimo wyższych kosztów utrzymania organizmu (w porównaniu do matek z linii L-BMR), matki z linii H-BMR były w stanie budować kompromis między opieką rodzicielską a odpowiedzią immunologiczną, jednak w sposób zależny od temperatury otoczenia. Usuwanie warstwy izolacyjnej nie sprawdziło się jako sposób na uwalnianie matek od limitów w rozpraszaniu metabolicznego ciepła, przynajmniej w wykorzystanym przeze mnie w pracy modelu badawczym. Wynik ten może sugerować, że sierść nie stanowi największej przeszkody w rozpraszaniu ciepła u samic myszy laboratoryjnych o różnym BMR. Zebrane dane nie dostarczają jednoznacznego poparcia dla założeń hipotezy HDL.

6. Spis literatury

- Akbar Z., Gorman M.L. (1993). The effect of supplementary feeding upon the demography of a population of woodmice *Apodemus sylvaticus*, living on a system of maritime sand-dunes. *Journal of Zoology*. 230, 609–661.
- Al Jothery A., Król E., Hawkins J., Chetoui A., Saint-Lambert A., Gamo Y., Shaw S. C., Valencak T., Bünger L., Hill W. G., Vaanholt L. M., Hambly C., Speakman, J.R. (2014). Limits to sustained energy intake. XXII. Reproductive performance of two selected mouse lines with different thermal conductance. *Journal of Experimental Biology*. 217, 3718-3732.
- Bao M.H., Chen L.B., Catherine Hambly C., Speakman J.H., Zhao Z.J. (2020). Exposure to hot temperatures during lactation in Swiss mice stunts offspring growth and decreases future reproductive performance of female offspring. *Journal of Experimental Biology*. 223, jeb223560. doi:10.1242/jeb.223560.
- Boutin S. (1990). Food supplementation experiments with terrestrial vertebrates: patterns, problems, and the future. *Canadian Journal of Zoology*. 68, 203-220.
- Buttgereit F., Burmester G.R., Brand M.D. (2000). Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Trends in Immunology*. 21, 194-199.
- Cai X., Yang M., Zhong W., Wang, D. (2009). Humoral immune response suppresses reproductive physiology in male Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Zoology* 112, 69-75.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*. 84, 277–359.
- Carlton E.D., Cooper C.L., Demas G.E. (2014) Metabolic stressors and signals differentially affect energy allocation between reproduction and immune function. *General and Comparative Endocrinology*. 208, 21–29.
- Chinn I. K., Blackburn C.C, Manley N.R., Sempowski G.D. (2012). Changes in Primary Lymphoid Organs With Aging. *Seminars in Immunology*. 24 (5), 309-320.
- Contreras-Garduno J., Rodriguez M.C., Rodriguez M.H., Alvarado-Delgado A., Lanz-Mendoza H. (2013). Cost of immune priming within generations: trade-off between infection and reproduction. *Microbes and Infection*. 16, 261-267.
- Cutrer A. P., Zenuto R. R., Luna F., Antenucci, C. D. (2010). Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. *Journal of Experimental Biology*. 213, 715-724.
- Demas G. E., Chefer V., Talan M. I., Nelson R. J. (1997). Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology*. 273, R1631-R1637.
- Demas, G. E., Johnson, C., Polacek, K. M. (2004). Social interactions differentially affect reproductive and immune responses of Siberian hamsters. *Physiology & Behaviour*. 83, 73-79.
- Deng G.M., Yu J.X, Xu J.Q, Bao Y.F, Chen Q., Cao J., Zhao Z.J (2020). Exposure to artificial wind increases energy intake and reproductive performance of female Swiss mice (*Mus musculus*) in hot temperatures. *Journal of Experimental Biology*. 223, jeb231415. doi:10.1242/jeb.231415.
- Derting T.L., Compton S. (2003). Immune response, not immune maintenance, is energetically costly in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Physiological and Biochemical Zoology*. 76 (5), 744–52.
- Drózd A. (1968). Digestibility and assimilation of natural foods in small rodents. *Acta Theriologica*, 21, 367-389.

- Drożdż A. (1975). Metabolic cages for small mammals. In *Methods for Ecological Bioenergetics, International Biological Programme Handbook No. 24* (ed. W. Grodzinski, R. Z. Klekowski and A. Duncan), 346-351. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Duah O.A., Monney K.A, Hambly C., Król E., Speakman J.R. (2013). Limits to sustained energy intake. XVII. Lactation performance in MF1 mice is not programmed by fetal number during pregnancy. *Journal of Experimental Biology*. 216, 2339-2348.
- Duarte L.C., Vaanholt L.M., Sinclair R.E., Gamo Y, Speakman J.R. (2010). Limits to sustained energy intake XII: is the poor relation between resting metabolic rate and reproductive performance because resting metabolism is not a repeatable trait? *Journal of Experimental Biology*. 213, 278-287.
- French S.S., DeNardo., Moore M.C. (2007) Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction? *The American Naturalist*. 170 (1), 79– 89.
- Gamo Y., Bernard A., Mitchell S. E., Hambly C., Al Jothery A., Vaanholt L. M., Król E., Speakman J.R. (2013a). Limits to sustained energy intake. XVI. Body temperature and physical activity of female mice during pregnancy. *Journal of Experimental Biology*. 216, 2328-2338.
- Gamo Y., Troup C., Mitchell S. E., Hambly C., Vaanholt L. M., Speakman R. J. (2013b). Limits to sustained energy intake. XX. Body temperatures and physical activity of female mice during lactation. *Journal of Experimental Biology*. 216, 3751-3761.
- Gamo Y., Bernard A., Troup C., Munro F., Derrer K., Jeannesson N., Campbell A., Gray H., Miller J., Dixon J., Mitchell S.E., Hambly C., Vaanholt L.M., Speakman J.R. (2016). Limits to sustained energy intake XXIV: impact of suckling behavior on the body temperatures of lactating female mice. *Scientific Reports*. 6, 25665.
- Garton, D.W., Hsu, M.J., Harder, J.D., 1994. Environmental temperature and metabolic rates during gestation and lactation in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Physiological Zoology*. 67, 497–514.
- Genoud M. (2022). The seasonal variation of basal metabolic rate is related to the expression of torpor among small mammals. *Journal of Thermal Biology*. 104, 103197.
- Gębczyński, A. K. (2005). Daily variation of thermoregulatory costs in laboratory mice selected for high and low basal metabolic rate. *Journal of Thermal Biology*. 30, 187-193.
- Gębczyński A.K., Konarzewski M. (2011). Effects of oxygen availability on maximum aerobic performance in *Mus musculus* selected for basal metabolic rate or aerobic capacity. *Journal of Experimental Biology*. 214, 1714-1720.
- Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W. (2004). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Gorman M.L., Ahmad Z. (1993) A comparative-study of the ecology of wood mice *Apodemus sylvaticus* in 2 contrasting habitats—deciduous woodland and maritime sand-dunes. *Journal of Zoology*. 229, 385–396.
- Gui J., Zhu X., Dohkan J., Cheng L., Barnes P.F., Su D.G. (2007). The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *International Immunology* 19 (10), 1201-1211.
- Hammond K.A., Diamond J. (1992). An Experimental Test for a Ceiling on Sustained Metabolic Rate in Lactating Mice. *Physiological Zoology*. 65 (5), 952-977.
- Hammond K.A., Diamond J. (1994). Limits to dietary nutrient intake and intestinal nutrient uptake in lactating mice. *Physiological Zoology*. 67, 282-303.
- Hammond K.A., Lloyd K.C.K., Diamond J. (1996). Is mammary output capacity limiting to lactational performance in mice? *Journal of Experimental Biology*. 199, 337–349.
- Hegemann A., Matson K. D., Flinks H., Tielema, B. I. (2013). Offspring pay sooner, parents pay later: experimental manipulation of body mass reveals trade-offs between immune function, reproduction and survival. *Frontiers in Zoology* 10, 77.

- Horn C.J., Luong L.T. (2021). Trade-offs between reproduction and behavioural resistance against ectoparasite infection. *Physiology & Behavior*. 239, 113524.
- Horst A.K., Kumashie K.G., Neumann K., Diehl L., Tiegs G. (2021). Antigen presentation, autoantibody production, and therapeutic targets in autoimmune liver disease. *Cellular & Molecular Immunology*. 18, 92–111.
- Huang Y.X., Li H.H., Wang L., Min H.X., Xu J.Q., Wu S.L., Cao J., Zhao Z.J. (2020). The ability to dissipate heat is likely to be a more important limitation on lactation in Striped Hamsters with greater reproductive efforts under warmer condition. *Physiological and Biochemical Zoology*. 93 (4), 282–295.
- IPCC (2022) Summary for Policymakers [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, M. Tignor, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem (eds.)]. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3-33, doi:10.1017/9781009325844.001.
- Johnson M.S., Thomson S.C., Speakman J.R. (2001a). Limits to sustained energy intake I. Lactation in the laboratory mouse *Mus musculus*. *Journal of Experimental Biology*. 204, 1937–1946.
- Johnson M.S., Thomson S.C., Speakman J.R. (2001b). Limits to sustained energy intake III. Effects of concurrent pregnancy and lactation in *Mus musculus*. *Journal of Experimental Biology*. 204, 1947–1956.
- Johnson M.S., Speakman J.R. (2001). Limits to sustained energy intake V. Effect of cold-exposure during lactation in *Mus musculus*. *Journal of Experimental Biology*. 204, 1967–1977 (2001).
- Kagya-Agyemang J.K., Vaanholt L.M., Hambly C., Krol E., Mitchell S.E., Speakman J.R. (2018). Limits to sustained energy intake. XXVIII. Beneficial effects of high dietary fat on lactation performance in mice. *Journal of Experimental Biology*. 221, jeb180828.
- Klasing KC. (2004). The costs of immunity. *Acta Zoologica Sinica*. 50, 961–969.
- Klein S.L., Nelson R.J. (1999). Influence of social factors on immune function and reproduction. *Reviews of Reproduction*. 4, 168–178.
- Konarzewski M., Diamond J. (1994). Peak Sustained Metabolic Rate and Its Individual Variation in Cold-stressed Mice. *Physiological Zoology*, 67 (5), 1186-1212.
- Konarzewski M., Książek A., Łapo I.B. (2005). Artificial selection on Metabolic Rates and Related Traits in Rodents. *Integrative and Comparative Biology*. 45, 416-425.
- Konarzewski, M., Książek, A. (2013). Determinants of intra-specific variation in basal metabolic rate. *Journal of Comparative Physiology B*. 183, 27-41.
- Król E., Speakman J.R. (2003a). Limits to sustained energy intake VI. Energetics of lactation in laboratory mice at thermoneutrality. *Journal of Experimental Biology* 206, 4255-4266.
- Król E., Speakman J.R. (2003b). Limits to sustained energy intake VII. Milk energy output in laboratory mice at thermoneutrality. *Journal of Experimental Biology* 206, 4267-4281.
- Król, E., Murphy, M., Speakman, J. R. (2007). Limits to sustained energy intake. X. Effects of fur removal on reproductive performance in laboratory mice. *Journal of Experimental Biology*. 210, 4233-4243.
- Książek A., Konarzewski M., Chadzińska M., Cichoń M. (2003). Costs of immune response in cold-stressed laboratory mice selected for high and low basal metabolism rates. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270, 2025-2031.
- Książek A., Konarzewski M., Łapo I. B. (2004). Anatomic and energetic correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiological and Biochemical Zoology*. 77, 890-899.

- Książek A., Czerniecki J., Konarzewski M. (2009). Phenotypic flexibility of traits related to energy acquisition in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *Journal of Experimental Biology*. 212, 808-814.
- Książek A., Konarzewski M. (2012). Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiological and Biochemical Zoology*. 85, 51-61.
- Książek A., Konarzewski M. (2016). Heat dissipation does not suppress an immune response in laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *Journal of Experimental Biology*. 219, 1542-1551.
- Lacy R. C., Lynch C.B. (1979). Quantitative genetic analysis of temperature regulation in *Mus musculus*. I. Partitioning of variance. *Genetics*. 91, 743-753.
- Leshchinsky T.V., Klasing K.C. (2001). Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Developmental & Comparative Immunology*. 25, 629-638.
- Levinsky I., Flemming S., Svenning J.C., Rahbek C. (2007). Potential impacts of climate change on the distributions and diversity patterns of European mammals. *Biodiversity and Conservation*. 16, 3803-3816.
- Li Y.G., Yan Z.C., Wang D.H. (2010). Physiological and biochemical basis of basal metabolic rates in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) and Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 157, 204-211.
- Lochmiller R.L., Deerenberg C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Acta Oecologica Scandinavica*. 88, 87-98.
- Luheshi G.N. (1998). Cytokines and Fever: Mechanisms and Sites of Action. *Molecular Mechanisms of Fever*. 856 (1), 83-89.
- Luna F., Naya H., Naya D.E. (2017) Understanding evolutionary variation in basal metabolic rate: An analysis in subterranean rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 206, 87-94.
- Martin L. B., Scheuerlein A., Wikelski M. (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science* 270, 153-158.
- Martin L.B., Weil Z.M., Nelson R.J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363, 321-339.
- McKechnie A.E. (2008). Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review. *Journal of Comparative Physiology B* (2008) 178: 235-247.
- Meijer T, Drent R. (1999). Re-examination of the capital and income dichotomy in breeding birds. *International Journal of Avian Science*. 141, 399-414.
- Mentesana L., Hau M. (2022). Glucocorticoids in a warming world: Do they help birds to cope with high environmental temperatures? *Hormones and Behaviour*. 142, 105178.
- Minozzi G., Parmentier H.K., Nieuwland M.G.B., Bedhom B., Minvielle F., Gourichon D., Pinard-van der Laan M.H. (2007). Antibody responses to keyhole limpet hemocyanin, lipopolysaccharide and Newcastle Disease Virus Vaccine in F2 and Backcrosses of White Leghorn Lines Selected for Two Different Immune Response Traits. *Poultry Science* 86, 1316-132.
- Ohrnberger S.A., Hambly C., Speakman J.R., Valencak T.G. (2018). Limits to sustained energy intake. XXIX. The case of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Experimental Biology*. 221, jeb183749.
- Ohrnberger S.A., Hambly C., Speakman J.R. Valencak T.G. (2020). Limits to sustained energy intake. XXXII. Hot again: dorsal shaving increases energy intake and milk output in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Experimental Biology*. 223, jeb230383.

- Paul M. J., Tuthill C., Kauffman A. S., Zucker I. (2010). Pelage insulation, litter size, and ambient temperature impact maternal energy intake and offspring development during lactation. *Physiological Behavior*. 100, 128-134.
- Peterson C.C., Nagy K.A., Diamond J. (1990) Sustained metabolic scope. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 87, 2324–2328.
- Pigliucci M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution*. 20(9), 481-6.
- Reade A.J., Dillon B., Nauga D. (2019). Spare to share? How does interindividual variation in metabolic rate influence food sharing in the honeybee? *Journal of Insect Physiology*. 112, 35–38.
- Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology*. 13, 267–276.
- Roff, D. A. (2002). Life History Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Rogowitz G.L. (1998). Limits to milk flow and energy allocation during lactation of the Hispid Cotton Rat (*Sigmodon hispidus*). *Physiological Zoology*. 71(3), 312-20.
- Roitt I., Brostoff J. Male D. (2000). Immunology. London: Mosby.
- Ronning B., Jensen H., Moe B., Bech C. (2007). Basal metabolic rate: heritability and genetic correlations with morphological traits in the zebra finch. *Journal of Evolutionary Biology*. 20, 1815–1822.
- Sabat P., Cavieres G., Veloso C., Canals M., Bozinovic F. (2009). Intraspecific basal metabolic rate varies with trophic level in rufous-collared sparrows. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154, 502–507.
- Sabat P., Ramirez-Otarola N., Barcelo G., Salinas J., Bozinovic F. (2010). Comparative basal metabolic rate among passerines and the food habit hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 157, 35–40.
- Sadowska, J., Gębczyński, A. K., Konarzewski, M. (2013). Basal metabolic rate is positively correlated with parental investment in laboratory mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*. 280, 2012-2576.
- Sadowska J., Gębczyński A.K., Paszko K., Konarzewski M. (2015a). Milk output and composition in mice divergently selected for basal metabolic rate. *Journal of Experimental Biology*. 218, 249-254.
- Sadowska E.T., Stawski C., Rudolf A., Dheyongera G., Chrzęścik K.M., Baliga- Klimczyk K., Koteja P. (2015b). Evolution of basal metabolic rate in bank voles from a multidirectional selection experiment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*. 282: 20150025.
- Sadowska E. T., Król E., Chrzęścik K, M. Rudolf A. M., Speakman J. R., Koteja, P. (2016). Limits to sustained energy intake. XXIII. Does heat dissipation capacity limit the energy budget of lactating bank voles? *Journal of Experimental Biology*. 219, 805-815.
- Sadowska J., Gębczyński A.K., Lewoc M., Konarzewski M. (2019). Not that hot after all: no limits to heat dissipation in lactating mice selected for high or low BMR. *Journal of Experimental Biology*. 222, jeb204669.
- Schmidt-Nielsen K. (1997). Animal Physiology: Adaptation and Environment. Cambridge University Press.
- Schoep I., Pillay N., Schradin C. (2017). Trade-offs between reproduction and health in free-ranging African striped mice. *Journal of Comparative Physiology B*. 187, 625–637.
- Segner H., Verburg-van Kemenade B.M.L., Chadzinska M. (2017). The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: Proximate mechanism for reproduction-immune trade-offs? *Developmental and Comparative Immunology* 66, 43-60.
- Selman C., Korhonen T. K., Bünger L., Hill W.G., Speakman J. R. (2001). Thermoregulatory responses of two mouse *Mus musculus* strains selectively bred for high and low food intake. *Journal of Comparative Physiology B*. 171, 661-668.

- Simons M. J. P., Reimert I., van der Vinne, V., Hambly, C., Vaanholt, L. M., Speakman, J. R., Gerkema, M. P. (2011). Ambient temperature shapes reproductive output during pregnancy and lactation in the common vole (*Microtus arvalis*): a test of the heat dissipation limit theory. *Journal of Experimental Biology* 214, 38-49.
- Speakman, J. R. (1997). Doubly labelled water: theory and practice. London: Chapman & Hall.
- Speakman J. R., Król E. (2005a). Limits to sustained energy intake IX: a review of hypotheses. *Journal of Comparative Physiology B* 175, 375-394.
- Speakman, J. R., Król, E. (2005b). Comparison of different approaches for the calculation of energy expenditure using doubly label water in a small mammal. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78, 650-667.
- Speakman J.R. (2008). The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363, 375–398.
- Speakman J.R., Król E. (2010). The Heat Dissipation Limit Theory and Evolution of Life Histories in Endotherms—Time to Dispose of the Disposable Soma Theory? *Integrative and Comparative Biology*, pp. 1–15.
- Speakman J.R., Król E. (2011). Limits to sustained energy intake. XIII. Recent progress and future perspectives. *Journal of Experimental Biology* 214, 230-241.
- Stearns, S. C. (2002). The Evolution of Life Histories. Oxford: Oxford University Press.
- Swaminathan A., Lucas R.M., Dear K., McMichael A.J. (2017). Keyhole limpet haemocyanin— a model antigen for human immunotoxicological studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 78 (5), 1135-1142.
- Swanson D.L., McKechnie A.E., Vézina F. (2017). How low can you go? An adaptive energetic framework for interpreting basal metabolic rate variation in endotherms. *Journal of Comparative Physiology B*. 187, 1039–1056.
- Tang Z.R., Chen S.Y., Lu W., Zhang H.D., Li M., Liu J.S. (2022). Morphological and physiological correlates of among- individual variation in basal metabolic rate in two passerine birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 267, 111160.
- Thapa P., Farber D.L. (2019). The role of the thymus in immune response. *Thoracic Surgery Clinics*. 29 (2), 123-131.
- Thomas C.D., Cameron A. Green R.E., Bakkenes M., Beaumont L.J., Collingham Y.C., Erasmus B.F.N., Ferreira de Siqueira M., Grainger A., Hannah L., Hughes L., Huntley B., van Jaarsveld A.S., Midgley G.F., Miles L., Ortega-Huerta M.A., Peterson A.T., Phillips O.L., Williams S.E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*. 427 (6970), 145-148.
- Vaanholt L.M., Sinclair R.E., Speakman J.R., (2013). Limits to sustained energy intake. XIV. Heritability of reproductive performance in mice. *Journal of Experimental Biology* 216, 2308-2315.
- Valencak T. G., Hackländer K., Ruf T. (2010). Peak energy turnover in lactating European hares: a test of the heat dissipation limitation hypothesis. *Journal of Experimental Biology* 213, 2832-2839.
- Valencak T. G., Wright P., Weir A., Mitchell S.E., Vaanholt L. M., Hambly C., Król E., Speakman J. R. (2013). Limits to sustained energy intake. XXI. Effect of exposing the mother, but not her pups, to a cold environment during lactation in mice. *Journal of Experimental Biology*. 216, 4326-4333.
- Vinne V., Simons M.J.P., Reimert I., Gerkema M.P. (2014). Temporal niche switching and reduced nest attendance in response to heat dissipation limits in lactating common voles (*Microtus arvalis*). *Physiology & Behavior*. 128, 295–302.
- Weiner J. (1989). Metabolic constraints to mammalian energy budgets. *Acta Theriologica*. 34, 3–35.
- Weiner J (1992). Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *Trends in Ecology and Evolution*. 7, 384–388.

- Welbergen J. Klose S.M., Markus N., Eby P. (2007). Climate change and the effects of temperature extremes on Australian flying-foxes. *Proceedings of the Royal Society B*. 275, 418-425.
- Wen J., Tan S., Qiao Q.G., Fan W.J., Huang Y.X., Cao J., Liu J.S., Wang Z.X., Zhao Z.J. (2017). *Journal of Experimental Biology* 220, 2277-2286.
- White C.R., Kearney M.R. (2013). Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *Journal of Comparative Physiology B*. 183, 1–26.
- Wu, S.H., Zhang, L.N., Speakman, J. R., Wang, D.H. (2009). Limits to sustained energy intake. XI. A test of the heat dissipation limitation hypothesis in lactating Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Journal of Experimental Biology*. 212, 3455-3465.
- Xu Y.C., Yang D.B., Wang D.H. (2012). No Evidence for a Trade-Off between Reproductive Investment and Immunity in a Rodent. *PLoS ONE*. 7(5), e37182.
- Yang D. B., Li L., Wang L. P., Chi Q. S., Hambly C., Wang D. H., Speakman, J. R. (2013a). Limits to sustained energy intake. XIX. A test of the heat dissipation limitation hypothesis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Experimental Biology*. 216, 3358-3368.
- Yang D.B., Xu Y.C., Wang D.H., Speakman J.R. (2013b). Effects of reproduction on immunosuppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history tradeoffs, are tissue and assay dependent. *Journal of Experimental Biology*. 216, 4242-4250.
- Zhang X.Y. Wang D.H. (2007). Thermogenesis, food intake and serum leptin in cold-exposed lactating Brandt's voles *Lasiopodomys brandtii*. *Journal of Experimental Biology*. 210, 512-521.
- Zhao Z. J., Cao J. (2009). Effect of fur removal on the thermal conductance and energy budget in lactating Swiss mice. *Journal of Experimental Biology*. 212, 2541-2549.
- Zhao Z.J., Chi Q.S., Cao J. (2010a). Limits to sustainable energy budget during lactation in the striped hamster (*Cricetulus barabensis*) raising litters of different size. *Zoology*. 113, 235-242.
- Zhao Z.J., Chi Q.S., Cao J. (2010b). Milk energy output during peak lactation in shaved Swiss mice. *Physiology & Behavior*. 101, 59–66.
- Zhao Z.J. (2011). Energy budget during lactation in striped hamsters at different ambient temperatures. *Journal of Experimental Biology*. 214, 988-995
- Zhao Z.J., Król E., Moille S., Gamo Y., Speakman J.R. (2013a). Limits to sustained energy intake. XV. Effects of wheel running on the energy budget during lactation. *Journal of Experimental Biology*. 216, 2316-2327.
- Zhao Z.J., Song D.G., Su Z.C., Wei W.B., Liu X.B., Speakman J.R. (2013b). Limits to sustained energy intake. XVIII. Energy intake and reproductive output during lactation in Swiss mice raising small litters. *Journal of Experimental Biology*. 216, 2349-2358.
- Zhao Z.J., Li L., Yang D.B., Chi Q.S., Hambly C., Speakman J.R. (2016). Limits to sustained energy intake XXV: milk energy output and thermogenesis in Swiss mice lactating at thermoneutrality. *Scientific Reports*. 6, 31626.
- Zhao Z.J., Deros D., Gerrard A., Wen J., Liu X., Tan S., Hambly C., Speakman J.R. (2020a). Limits to sustained energy intake. XXX. Constraint or restraint? Manipulations of food supply show peak food intake in lactation is constrained. *Journal of Experimental Biology*. 223, jeb208314.
- Zhao Z.J. Hambly C., Shi L.L., Bi Z.Q., Cao J., Speakman J.R. (2020b). Late lactation in small mammals is a critically sensitive window of vulnerability to elevated ambient temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 117, 24352-24358.