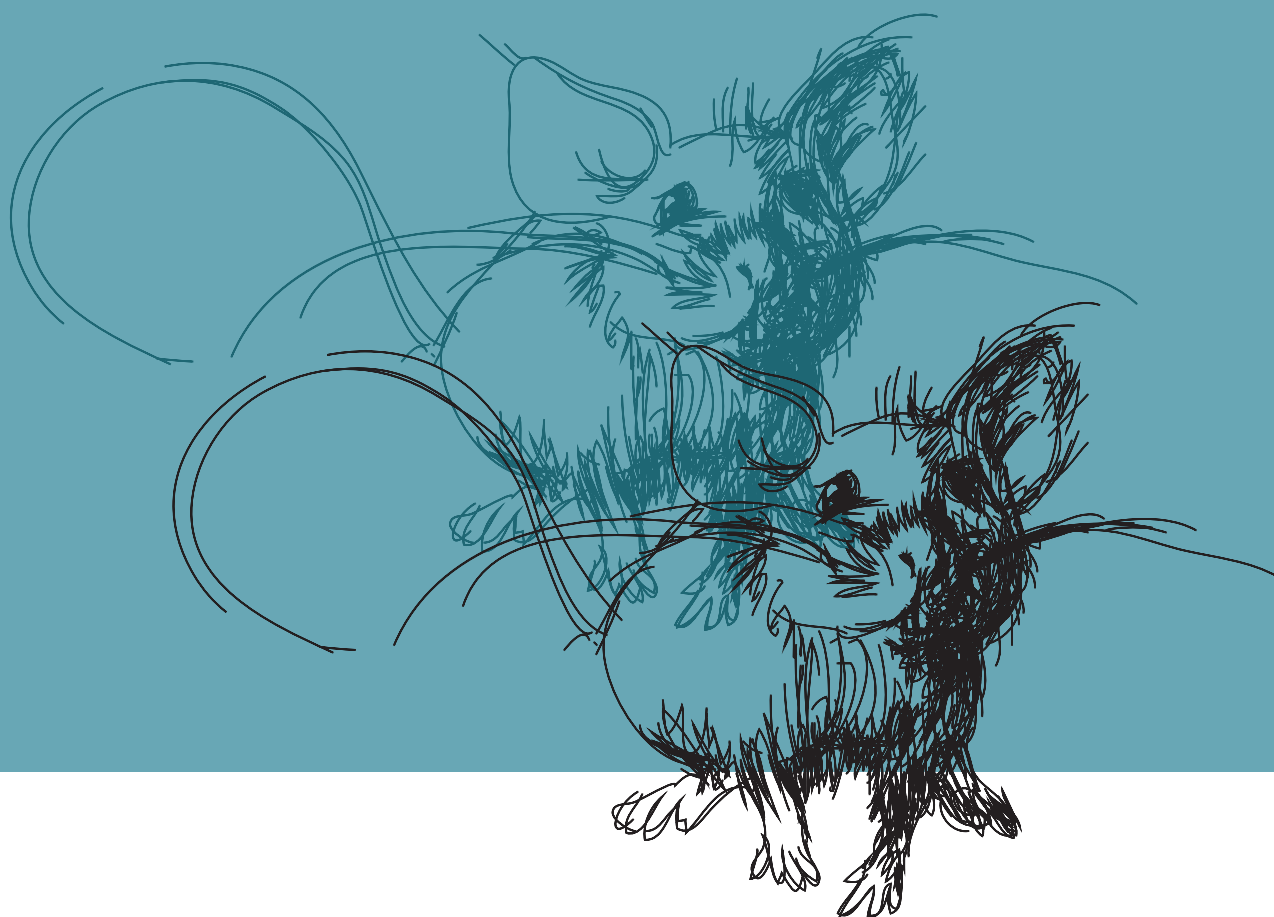
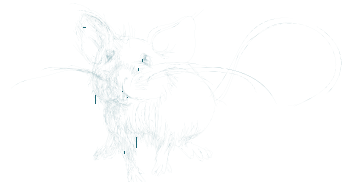




POSKUSNE ŽIVALI V BIOMEDICINSKIH RAZISKAVAH

UČBENIK ZA DELO S POSKUSNIMI ŽIVALMI

Urednica: Valentina Kubale



Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani
Ljubljana, 2012

POSKUSNE ŽIVALI V BIOMEDICINSKIH RAZISKAVAH

UČBENIK ZA DELO S POSKUSNIMI ŽIVALMI

Prva izdaja

Urednica: Valentina Kubale

Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2012

POSKUSNE ŽIVALI V BIOMEDICINSKIH RAZISKAVAH

UČBENIK ZA DELO S POSKUSNIMI ŽIVALMI

Urednica: doc. dr. Valentina Kubale, dr. vet. med.

Recenzenti:

prof. dr. Nina Čebulj Kadunc, dr. vet. med.
doc. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol.
Urška Galjot, dr. vet. med.
prof. dr. Peter Hostnik, dr. vet. med.
dr. Rok Keber, univ. dipl. biol.
asist. dr. Barbara Lukanec, dr. vet. med.
Marko Mahne, dr. vet. med.
zn. sod. dr. Mateja Manček Keber, univ. dipl. mikrobiol.
zn. sod. dr. Branko Krt, dr. vet. med.
prof. dr. Andrej Pengov, dr. vet. med.
asist. dr. Štefan Pintarič, dr. vet. med.
asist. dr. Tanja Plavec, dr. vet. med.
doc. dr. Joško Račnik, dr. vet. med.
prof. dr. Janez Salobir, univ. dipl. inž. kmet.
prof. dr. Miha Sok, dr. med.
prof. dr. Stanislav Šuškovič, dr. med.
doc. dr. Tatjana Tišler, univ. dipl. biol.
prof. dr. Polona Tominc, univ. dipl. ekonom.
prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, dr. vet. med.
asist. dr. Monika Cecilija Žužek, dr. vet. med.

Lektura: dr. Andreja Perič Jezernik, dr. Nina Novak Kerbler, Erna Zajamšek

Oblikovanje: Tina Pregelj Skrt (Mint colibri, s. p.), Valentina Kubale

Fotografije: Valentina Kubale, Irena Zdovc, Vladimira Erjavec

Tipologija/vrsta publikacije: visokošolski učbenik z recenzijo

Izdajatelj: Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

Kraj izdaje: Ljubljana

Naklada: digitalni tisk

Število izvodov: 200 CD-ROM

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

636.028(075.8)(086.034.44)

POSKUSNE živali v biomedicinskih raziskavah [Elektronski vir] : učbenik za delo s poskusnimi živalmi / urednica Valentina Kubale. - 1. izd. - Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2012

ISBN 978-961-6199-60-5

1. Kubale, Valentina
264766464

© Vse pravice, še posebej pravica do razmnoževanja in razširjanja, so pridržane. Delo je avtorsko zaščiteno. Reprodukcijska po delih ali v celoti ni dovoljena brez pisnega dovoljenja.

PREDGOVOR

Za skrb za živali v poskusu v širšem pomenu besede (oz. poskusne živali, kot največkrat govorimo), je potrebnih mnogo raznolikih znanj, ki izhajajo iz različnih vrst poklicev. Za odgovorno delo s poskusnimi živalmi sta potrebna tudi usposabljanje in izobraževanje, pridobljena s tečajem za delo s poskusnimi živalmi.

Visokošolski učbenik z recenzijo je v prvi vrsti pripravljen za udeležence tečajev za delo s poskusnimi živalmi, za vodje, izvajalce poskusov, strokovnjake za zaščito živali, oskrbnike živali. Namenjen pa je vsem, ki že delajo z živalmi v poskusu, da lahko osvežijo svoje znanje in v učbeniku najdejo pomembne informacije, ki jih potrebujejo pri izvedbi poskusa. Namenjen je študentom Veterinarske fakultete in drugih fakultet, ki potrebujejo tovrstne informacije. Namenjen je tudi vsem ostalim zainteresiranim, ki bodo v prihodnosti morda delali s poskusnimi živalmi ali pa želijo razširiti svoje znanje.

Začetki priprave učbenika segajo že v prvo verzijo pripravljenega gradiva za slušatelje tečaja za delo s poskusnimi živalmi iz leta 2007, nastalega kot zbirka predavanj na usposabljanju za delo s poskusnimi živalmi, ki je zakonska obveza za vse štiri kategorije udeležencev pri poskusih na živalih. Predmetnik je bil že takrat sestavljen po priporočilih Evropske zveze društev za zaščito živali FELASA. Program izobraževanja pa je v Republiki Sloveniji odobrila Veterinarska uprava RS. Učbenik je nadgradnja gradiva v smeri novejših smernic FELASA in zakonodaje.

Digitalna verzija izdaje učbenika je prva tovrstna izdaja, ker jo bo lažje dopolnjevati in spreminjati glede na predvidene spremembe v prihajajoči zakonodaji, kot tudi dopolnjevati z novimi koristnimi informacijami.

Poskusne živali so živa bitja, žal je njihova uporaba, čeprav jo želimo na več različnih načinov čim bolj omejiti, še vedno zelo pomembna in v biomedicinskih raziskavah še ne popolnoma nadomestljiva. Za dobro počutje poskusnih živali želimo poskrbeti na več ravneh. Učbenik in tečaj sta pomembna vira informacij, ki lahko omogočata uspešno in pravilno delo s poskusnimi živalmi. Za dobro počutje poskusnih živali pa je pomembno tudi urjenje rutine pri ravnanju s poskusnimi živalmi, preden pričnemo s poskusom in tehnikami, ki jih uporabljamo v poskusu. Pomanjkanje samozavesti pri ravnanju z živalmi ali morda celo strah pred živalmi lahko povzroči negotovost pri poskusnih živalih, kar lahko vodi do agresivnega obnašanja živali in posledičnega vpliva na biološke parametre pri živalih, ki nas zanimajo. Zato skušata oba pripomočka pomagati na poti do samozavestnega, pravilnega in izkušenega ravnanja s poskusnimi živalmi.

Zahvaljujem se vsem avtorjem za njihove dragocene prispevke ter sodelovanje pri tečaju za delo s poskusnimi živalmi, vsem recenzentom za njihove pomembne prispevke k izboljšavi učbenika, vsem lektorjem, mag. Giti Grecs Smole in prof. dr. Silvestri Kobal za pomoč pri nastajanju učbenika ter vsem donatorjem, ki so prispevali h kakovosti učbenika.

Valentina Kubale

SEZNAM AVTORJEV

prof. dr. Majda Bastič, univ. dipl. ekonom.

Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor

prim. prof. dr. Marjan Bilban, dr. med., specialist medicine dela, prometa in športa

ZVD Zavod za varstvo pri delu, d. d., Ljubljana

prof. dr. Vojteh Cestnik, dr. vet. med.

Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

znani. svet. prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana

doc. dr. Manica Černe, dr. vet. med.

Oddelek za toksikologijo, Lek, d. d., Ljubljana

prof. dr. Martin Dobeic, dr. vet. med.

Inštitut za higieno okolja in živali z etologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med.

Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

doc. dr. Vladimira Erjavec, dr. vet. med.

Klinika za kirurgijo in male živali, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Robert Frangež, dr. vet. med.

Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

asist. dr. Mitja Gombač, dr. vet. med.

Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

asist. Marjana Grandič, dr. vet. med.

Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Simon Horvat, univ. dipl. inž. zoot.

Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

dr. Sonja Jeram, dipl. univ. biol.

Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije

prof. dr. Silvestra Kobal, dr. vet. med.

Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

dr. Urška Kos, dr. vet. med.

Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje

doc. dr. Valentina Kubale, dr. vet. med.

Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Gregor Majdič, dr. vet. med.

Center za genomiko, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Tadej Malovrh, dr. vet. med.

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

doc. dr. Janko Mrkun, dr. vet. med.

Klinika za reprodukcijo in konje, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

viš. zn. sod. dr. Matjaž Očepek, dr. vet. med.

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Andrej Orešnik, dr. vet. med.

Katedra za prehrano, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

dr. Dragica Ornik, dr. vet. med.

Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje

mag. Tomislav Paller, dr. vet. med.

Nacionalni veterinarski inštitut, enota Ljubljana

doc. dr. Tatjana Pirman, univ. dipl. kmet. inž. živ.

Katedra za prehrano, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Azra Pogačnik, dr. vet. med.

Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Milan Pogačnik, dr. vet. med.

Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

doc. dr. Alenka Seliškar, dr. vet. med.

Klinika za kirurgijo in male živali, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

asist. dr. Tomaž Snoj, dr. vet. med.

Inštitut za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

doc. dr. Malan Štrbenc, dr. vet. med.

Bia, Ltd., Ljubljana

asist. dr. Tanja Švara, dr. vet. med.

Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

prof. dr. Milka Vrecl, dr. vet. med.

Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med.

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

Ana Zebič, dr. vet. med.

Krka, d. d., Novo mesto

KAZALO POGLAVIJ

1. ŽIVALI V POSKUSU V OKVIRU ZNANOSTI O LABORATORIJSKIH ŽIVALIH – NJIHOV PRISPEVEK PRI RAZVOJU MEDICINE V PRETEKLOSTI, SEDANJOSTI IN PRIHODNOSTI	1
<i>Valentina Kubale</i>	
2. VELJAVNA IN BODOČA ZAKONODAJA O ZAŠČITI POSKUSNIH ŽIVALI	8
<i>Dragica Ornik</i>	
3. NABAVA IN OZNAČEVANJE POSKUSNIH ŽIVALI	17
<i>Dragica Ornik</i>	
4. ETIKA UPORABE ŽIVALI V POSKUSU	23
<i>Milan Pogačnik</i>	
5. NAČELO »3R« V RAZISKOVALNEM DELU	32
<i>Ana Zebič</i>	
6. ANATOMIJA POSKUSNIH ŽIVALI	34
<i>Valentina Kubale, Azra Pogačnik, Malan Štrbenc</i>	
7. ANATOMIJA TER UPORABA PTIC IN PRIMATOV V BIOMEDICINSKIH RAZISKAVAH	49
<i>Valentina Kubale, Malan Štrbenc</i>	
8. FIZIOLOGIJA LABORATORIJSKIH POSKUSNIH ŽIVALI	53
<i>Vojteh Cestnik</i>	
9. FIZIOLOŠKE LASTNOSTI IN UPORABNOST DOMAČIH ŽIVALI V EKSPERIMENTALNE NAMENE	70
<i>Vojteh Cestnik</i>	
10. PREHRANA LABORATORIJSKIH ŽIVALI	83
<i>Tatjana Pirman, Andrej Orešnik</i>	
11. RAZMNOŽEVANJE LABORATORIJSKIH ŽIVALI	92
<i>Gregor Majdič, Janke Mrkun</i>	
12. NASTANITEV LABORATORIJSKIH ŽIVALI	98
<i>Tadej Malovrh</i>	
13. MIKROBIOLOŠKA STANDARDIZACIJA ŽIVALI	104
<i>Tadej Malovrh</i>	
14. GENETSKI MONITORING POSKUSNIH ŽIVALI	109
<i>Simon Horvat</i>	
15. TRANSGENE POSKUSNE ŽIVALI: METODIKA IN GLAVNI DEJAVNIKI ZA NAČRTOVANJE IN IZVAJANJE POSKUSOV	116
<i>Simon Horvat</i>	
16. TRANSGENE POSKUSNE ŽIVALI: ETIČNI IN ZAKONODAJNI VIDIKI	126
<i>Simon Horvat</i>	

17. KINETIKA APLICIRANIH UČINKOVIN <i>Silvestra Kobal, Tomaž Snoj</i>	129
18. NAČINI APLIKACIJE RAZLIČNIH PRIPRAVKOV POSKUSNIM ŽIVALIM; POSTOPKI IN PRINCIPI <i>Silvestra Kobal, Robert Frangež</i>	132
19. PATOFIZIOLOGIJA STRESA IN NJEGOV VPLIV NA RAZISKOVALNE REZULTATE <i>Marjana Grandič, Robert Frangež</i>	138
20. ZNAČILNOSTI OBNAŠANJA LABORATORIJSKIH ŽIVALI / ETOPATIJE <i>Martin Dobei</i>	146
21. DOBRO POČUTJE ŽIVALI <i>Martin Dobei</i>	151
22. HUMANI NAČINI USMRTITVE (EVTANAZIJA) POSKUSNIH ŽIVALI <i>Valentina Kubale, Ana Zebič</i>	155
23. BOLEZNI POSKUSNIH ŽIVALI IN PROGRAM ZDRAVSTVENEGA MONITORINGA V VZREJI <i>Alenka Dovč</i>	160
24. VARSTVO PRI DELU – ZAŠČITA OSEBJA PREGLED NAJPOMEMBNEJŠIH BAKTERIJSKIH IN GLIVIČNIH ZOONOZ, KATERIH VIR OKUŽBE SO LAHKO POSKUSNE ŽIVALI <i>Irena Zdovc</i>	167
25. ANESTEZIJA LABORATORIJSKIH ŽIVALI <i>Alenka Seliškar</i>	173
26. KIRURŠKI POSEGI PRI POSKUSNIH ŽIVALIH <i>Vladimira Erjavec</i>	186
27. KAJ POMENI BIOVARNOST IN BIOLOŠKA ZAŠČITA <i>Tadej Malovrh, Matjaž Očepek</i>	193
28. ŽIVALSKI MODELI IN UPORABA POSKUSNIH ŽIVALI V ONKOLOGIJI <i>Maja Čemažar</i>	197
29. ALTERNATIVNE METODE <i>Sonja Jeram</i>	206
30. CELIČNE KULTURE <i>Milka Vrecl</i>	211
31. NAČRTOVANJE ZNANSTVENO RAZISKOVALNEGA DELA <i>Manica Černe</i>	216
32. NAJPOGOSTEJŠE BOLEZNI IN POŠKODBE PRI DELU S POSKUSNIMI ŽIVALMI <i>Marjan Bilban</i>	

33. DDD (ČIŠČENJE, DEZINFEKCIJA, DEZINSEKCIJA, DERATIZACIJA) V REJAH LABORATORIJSKIH ŽIVALI	
<i>Martin Dobei</i>	248
34. UNIVARIATNA ANALIZA	
<i>Majda Bastič</i>	252
35. POSMRTNE SPREMEMBE, NAKLJUČNE NAJDBE PRI RAZTELESBI IN VNETJE	
<i>Mitja Gombač, Tanja Švara, Milan Pogačnik</i>	275
36. RAVNANJE S TRUPLI POGINULIH/USMRČENIH ŽIVALI IN STRANSKIMI ŽIVALSKIMI PROIZVODI, KI NISO NAMENJENI PREHRANI LJUDI	
<i>Tomislav Paller</i>	282
37. ZAŠČITA PRI PREVOZU POSKUSNIH ŽIVALI	
<i>Urška Kos</i>	286
38. EVIDENCE PRI DELU S POSKUSNIMI ŽIVALMI	
<i>Valentina Kubale</i>	291
39. SLOVENSKA ZAKONODAJA – PRIMERI	
<i>Valentina Kubale, Dragica Ornik</i>	305
40. RAVNANJE S PODGANAMI IN MIŠKAMI	
<i>Tomaž Snoj, Valentina Kubale</i>	308
41. NEKROPSIJA LABORATORIJSKIH PODGAN KOT PRIPRAVA ZA KIRURŠKE POSEGE PRI ŽIVIH ŽIVALIH	
<i>Valentina Kubale, Mitja Gombač</i>	311
42. TESTIRANJE OBNAŠANJA PRI PODGANAH	
<i>Tomaž Snoj, Valentina Kubale</i>	315
43. TEHNIKE ŠIVANJA	
<i>Vladimira Erjavec</i>	324
44. DAJANJE PRIPRAVKOV, JEMANJE KRVI TER EVTANAZIJA PRI PODGANAH IN MIŠIH	
<i>Tomaž Snoj, Silvestra Kobal, Marjana Grandič, Valentina Kubale</i>	327
45. NAVODILA ZA OBDELAVO ČLANKA	
<i>Valentina Kubale</i>	331

ŽIVALI V POSKUSU V OKVIRU ZNANOSTI O LABORATORIJSKIH ŽIVALIH – NJIHOV PRISPEVEK PRI RAZVOJU MEDICINE V PRETEKLOSTI, SEDANJOSTI IN PRIHODNOSTI

Valentina Kubale

UVOD

Raziskave, ki temeljijo na poskusnih živalih, so veliko doprinesle k napredku znanosti, še posebej k razvoju biomedicinskih raziskav, biologije in fiziologije živali ter humane biologije. S pomočjo živalskih modelov človeških bolezni smo dobili pomembne informacije s področja patofiziologije, diagnostike in zdravljenja humanih bolezni. Eksperimentalni podatki, pridobljeni iz živalskih študij, so služili kot osnova za večino ključnih kliničnih poskusov in s tem pripomogli k razvoju terapevtskih posegov. Uveljavljeni živalski modeli in modeli, ki se še razvijajo, bodo v prihodnosti pomagali najti odgovore na izzive, ki se pojavljajo na področju biomedicine. Na področju raziskav, ki temeljijo na poskusih na živalih, prihaja v zadnjem času do velikih sprememb zaradi razvozlave človeškega genoma ter genetskega koda več živalskih vrst, kar pomeni, da smo korak bližje določitvi funkcije posameznih genov.

Področja znanosti, pri katerih so poskusi na živalih že skozi zgodovino igrali veliko vlogo:

- diagnostika infekcijskih bolezni (steklina, rumena mrzlica);
- razumevanje dovzetnosti in rezistence ter razvoja protimikrobnih učinkovin;
- pridobivanje znanja na področju imunske biologije in delovanja imunskega sistema;
- razumevanje imunologije pri procesih transplantacije in razvoj tehnologij, ki to omogočajo;
- razvoj vakcin (črne koze, otroška paraliza);
- razvoj naprednih tehnik kirurgije pri operacijah srca in posredovanje pri kardiovaskularnih obolenjih;
- razvoj zdravljenja raka;
- identifikacija metaboličnih bolezni;
- karakterizacija nevroloških bolezni;
- dosežki v medicini na področju raziskovanja vesolja.

Znanost o laboratorijskih živalih je multidisciplinarna veda, nekako mejno področje med veterinarsko in humano medicino, in proučuje vsa področja, pomembna za znanstvenike, ki se ukvarjajo s poskusi na živalih, predvsem pri načrtovanju poskusov na živalih. Ukvarja se z biologijo in fiziologijo laboratorijskih živali in poskusnih živali v širšem pomenu besede, vzrejo laboratorijskih živali, standardizacijo okolja, genetskih vplivov ter mikrobiološko standardizacijo. Pomembna je za optimizacijo eksperimentalnih tehnik, načrtovanja poskusa, analitskih in statističnih metod, ki se uporabljajo pri načrtovanju poskusov in analiziranju pridobljenih podatkov poskusa. Zelo pomembno področje proučevanja je skrb za zdravje živali in zaščito živali, kamor spada zakonodaja na področju zaščite živali, ki postavlja temelje za veljavne zakone in pravilnike ter se nanje opira, in vedno bolj sprejeta etična načela, po katerih se je potrebno ravnati pri delu s poskusnimi živalmi. Poleg tega izboljšuje tehnike anestezije, analgezije in evtanazije živali. Pomemben del je iskanje alternativnih metod za delo s poskusnimi živalmi. Njen glavni cilj je skrb za dobro počutje (angl. welfare) poskusnih živali ter dvigovanje kvalitete poskusov. Delimo jo na temeljno znanost o laboratorijskih živalih, ki se ukvarja z zdravjem živali, genetiko, etiologijo, zakonodajo, primernim okoljem za živali, načrtovanjem poskusa in nekaterimi drugimi vejami znanosti, ter aplikativno, ki se ukvarja z razvojem primernih živalskih modelov, njihovo validacijo in uporabo.

Znanost o laboratorijskih živalih se ukvarja z ugotavljanjem dejavnikov, ki vplivajo na živali in posledično na raziskovalne rezultate ter njihovo standardizacijo in optimizacijo. Za uspešno študijo je

zelo pomembna standardizacija določene živalske vrste za določen tip poskusa. V zelo dobro načrtovanem in izvedenem poskusu lahko prihaja do variacij (razpršenosti). Najpogostejši vzrok za to so razlike med živalmi. Eden od najpomembnejših virov variacij v poskusu je žival sama – zaradi razlik v genetskem zapisu in različnih mikroorganizmov, ki naseljujejo žival. Standardizacija poskusov na živalih je proces definiranja lastnosti uporabljenih živali ter definiranje in vzdrževanje konstantnega okolja, v katerem so živali nastanjene, validiranje analitskih metod ter vnaprej izbranih statističnih metod. Cilj standardizacije je povečati zanesljivost in ponovljivost eksperimentalnih rezultatov. S standardiziranjem pogojev okolja in lastnosti živali sočasno izboljšamo primerljivost rezultatov poskusa znotraj laboratorija in med različnimi laboratoriji. Na ta način tudi zmanjšamo porabo živali v poskusih.

ZGODOVINA POSKUSOV NA ŽIVALIH

Zgodnji začetki poskusov

Vzporedno z razvojem medicinske znanosti se je že v času antike pričela uporaba poskusnih živali. V tem času seciranje človeških teles ni bilo dovoljeno, zato so uporabili živalska telesa. Eden najbolj poznanih zdravnikov iz tega obdobja, ki je z namenom pridobitve znanja o delovanju človeškega organizma seciral živali, je bil Hipokrat s Kosa (460–380 pr. n. št.). Rimski zdravnik Claude Galen (130–201 n. št.) je pri poskusih uporabljal različne živalske vrste, kot so psi, prašiči in opice, z namenom proučevanja fizioloških procesov v organizmu. Izsledki so mu pomagali pri vsakdanjem delu s humanimi pacienti. Za srednji vek je značilno, da zaradi miselnosti, ki ni bila najbolj naklonjena znanosti, ni posebnih zapisov o uporabi živali v poskusne namene.

Nadaljevanje poskusov na živalih po obdobju srednjega veka

Prva opažanja, pomembna za moderno znanost (še posebej na miših), segajo v čas humanizma, okrog leta 1600. Angleški zdravnik William Harvey (1578–1657) je s pomočjo uporabe poskusnih živali opisal krvožilni sistem. V naslednjem stoletju je angleški fiziolog Stephen Hales (1677–1761) na konju demonstriral meritve krvnega tlaka, oče »moderne« kemije, Antoine Lavoisier (1743–1794), pa je uporabil kalorimeter pri morskem prašičku (budri) ter pokazal, da je dihanje del izgorovanja.

Leta 1877 je nemški znanstvenik Robert Koch (1843–1910) dokazal, da se bakterija *Bacillus anthracis*, ki povzroča zelo nevaren vranični prasad (antraks), prenaša iz živali na žival. Z virusom je okužil ovce. Pokazal je tudi, da lahko bakterija povzroči točno določeno bolezen in da lahko izolirana in prečiščena bakterija iz primarnega gostitelja povzroči bolezen pri naslednjem gostitelju. Iz njegovih dognanj so se razvili Kochovi postulati – kriteriji za dokaz, da določeni mikroorganizem povzroča določeno bolezen. Postavil je tudi temelje intenzivnejši uporabi živali v poskusih, še posebej vezanih na infekcijske bolezni. Njegovi postulati so bili uporabljeni predvsem pri raziskavah hemoragične mrzlice z renalnim sindromom leta 1993, ki jo povzroča hantavirus, in Kaposijevim sarkomom, ki so ga leta 1995 povezali s herpesvirusom tipa 8.

Brez raziskav na živalih ne bi razvili učinkovitih vakcin proti kužnim mikrobom in njihovim toksinom. Glavni mejnik na tem področju je bil neodvisni razvoj vakcin proti črnim kozam in steklini, stoletja starim boleznim, ki so se odražale v resnih obolenjih oz. celo 100-odstotni smrtnosti. Leta 1789 je angleški podeželski zdravnik Edward Jenner (1749–1823) pri poskusnem cepljenju pri črnih kozah uporabil podoben virus kravjih ošpic. Pacienti, ki so bili cepljeni z virusom kravjih ošpic, so postali imuni na črne koze. Metoda je stoletje in pol kasneje služila kot temelj programa, ki ga je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) potrdila za eradikacijo črnih koz, in leta 1979 izkoreninila črne koze.

Francoski mikrobiolog Louis Pasteur (1822–1895) je bil prvi, ki je razvil pasivno imunizacijo. S prilagoditvijo divjega seva stekline na laboratorijske živali ali kulture je spremenil lastnosti virusov, kar danes imenujemo oslabljeni virusi. Z njihovo pomočjo so razvili vaccine proti steklini in otroški paralizi (poliomielitis).

Med klasične poskuse na živalih spada tudi trening psov, ki ga je okrog leta 1890 izvedel Ivan Pavlov, da so izločali slino ob zvoku zvonca in bili na ta način naučeni, da so povezali zvok s hrano.

Pomembnejša odkritja po 19. stoletju

Nekatera odkritja na področju medicine, ki jih ne bi mogli doseči brez uporabe poskusnih živali in so ogromnega pomena za človeštvo, segajo v pozno devetnajsto stoletje.

Takrat je nemški bakteriolog Emil von Behring (1854–1917) izoliral toksin davice in uporabil mešanico toksina in protitoksina ter z njo zaščitil budre pred razvojem bolezni. Kasneje je razvil uporabno vakcino za človeka. V 1920. letih je s pomočjo poskusov na psih kanadski znanstvenik na področju medicine, Frederick Banting (1891–1941), določil delovanje trebušne slinavke in proizvodnjo inzulina, za kar je dobil Nobelovo nagrado. Pred tem odkritjem so bili pacienti z diagnosticirano sladkorno boleznijo obsojeni na smrt. V 1940. in 1950. je skupina raziskovalcev s pomočjo antibiotika streptomicina pozdravila tuberkulozo pri budrah. Tem poskusom so sledili klinični poskusi na ljudeh, s katerimi so pokazali, da antibiotiki lahko zavrejo širjenje bolezni. Ameriški raziskovalec na področju medicine, Jonas Salk (1914–1995), je pri opicah *Rhesus* izoliral virus, ki povzroča otroško paralizo, in naredil vakcino proti otroški paralizi. Kasneje je ameriški raziskovalec Albert Sabin (1906–1993) pripravil živo vakcino, s katero je okužil živalske gostitelje, da je virus vzgojil. Leta 1965 je bila otroška paraliza izkoreninjena.

Prve hitro hlapljive anestetike so razvili leta 1950. Preizkusili so jih na večjem številu raznolikih živalskih vrst. Pionirske operacije zamenjave srčnih zaklopk je opravil izumitelj srčne zaklopke, srčno-žilni kirurg Albert Starr (1926–) leta 1960, opravil pa jih je na živalih. Primate so zelo veliko uporabljali pri raziskavah AIDS-a, predvsem opice *Rhesus*, na katerih so izvajali poskusne terapije.

Veliko znanja o strukturi protiteles so pridobili z raziskavami neoplastičnih plazmatskih celic, ki so jih pridobili iz mišjih mielomov. Z razpoznavo zgradbe protiteles in njihove masovne produkcije sta Cesar Milstein and Georges J. F. Köhler leta 1975 izumila metodo, s katero sta proizvajala hibridne celične linije (hibridome). Princip metode temelji na združitvi specifičnih limfocitov B, ki proizvajajo protitelesa in celice mieloma, ki so selekcionirane na zmožnost rasti v celični kulturi in niso zmožne sinteze protiteles. Limfocite B se pridobi iz vranic predhodno imuniziranih miši proti specifičnemu antigenu, ki nas zanima. Hibridne celične linije zato proizvajajo tip specifičnih protiteles, ki nas zanima, in so uporabne za diagnostiko, zdravljenje bolezni in purifikacijo biološkega materiala. Proizvodnja večje količine identičnih protiteles je pomembna za naše razumevanje imunskih reakcij in imunskega odgovora ter tudi proizvodnje sekundarnih protiteles. Leta 1984 sta si za ta dosežek na področju medicine in fiziologije delila Nobelovo nagrado z Niels Kaj Jerne.

Druga metoda, ki nam pomaga razumeti imunski odziv, je transplantacija. Tudi ta metoda je v preteklosti zelo povečala porabo živali. V laboratorijih Jackson (ZDA) so s transplantacijo kostnega mozga ozdravili obolele miške. Ameriški genetik, ki se je ukvarjal z mišmi in procesi imunologije pri transplantaciji, George Davis Snell iz iste institucije, je odkril genetske faktorje, ki so pomembni pri prenosu tkiv iz osebk na osebek. Leta 1980 si je z Barujem Benacerrafom and Jeanom Daussetom delil Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino za določitev struktur na celični površini, ki regulirajo imunske reakcije. Ugotovil je, kateri genetski faktorji so pomembni pri transplantaciji tkiva. Ukvarjal se je s pglavitnim histokompatibilnostnim kompleksom (PHK, angl. MHC).

Med letoma 1996 in 2005 je Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino prejelo pet od šestih nagrajencev, katerih dosežki se vsaj deloma opirajo na rezultate, pridobljene z uporabo poskusnih živali. Te raziskave kažejo na pomembno vlogo laboratorijskih živali v raziskovalnem procesu in na nek način kažejo na sprejetje metod, pri katerih se uporabljajo laboratorijske živali med znanstveniki.

Leta 1997 je Nobelovo nagrado za področje fiziologije in medicine za odkritje prionov (infekcioznih proteinskih delcev) prejel Stanley Pruisner. Prioni povzročajo nevrodegenerativne bolezni pri ovcah in kozah (praskavec), govedu (bolezen novih krav), losih in srnah (bolezen kroničnega hiranja) in pri človeku (creutzfeldt-jakobova bolezen in kuru). Na različnih sevih mišk so raziskovali lizo celic, okuženih z virusi.

Leta 1998 so Nobelovo nagrado z istega področja prejeli Robert Furchgott, Louis Ignarro in Ferid Murad. Na preparatih, pridobljenih iz aorte kuncev, so proučevali vlogo dušikovega oksida, ki je pomembna signalna molekula v srčno-žilnem sistemu ter ima pomembno funkcijo pri vnetju, apoptozi in prenosu živčnega impulza.

Leta 2000 so na področju fiziologije in medicine Nobelovo nagrado dobili Arvid Carlsson, Paul Greengard in Eric Kandel za pionirske raziskave in rezultate raziskav na področju počasnega sinaptičnega prenosa med nevroni in s tem povezanega razumevanja živčnih povezav, pomembnih za učenje in spomin.

Leta 2001 so Nobelovo nagrado s področja medicine in fiziologije prejeli Lealand Hartwell, Timothy Hunt in Paul Nurse za delo s področja ključnih urejevalcev celičnega cikla. Pri svojem delu so uporabljali morske ježke in kvasovke. Identificirali so ključne gene in njihove produkte, ki so pomembni pri delitvi celice in njeni rasti. Identificirali so več kot 100 različnih proteinov, ki sodelujejo pri celični delitvi – od ciklina odvisne proteinske kinaze (CDK), ki so v evkariontskih organizmih (od kvasovke do človeka) zelo ohranjene. Rezultati so pomembni za razvoj bodočih terapevtskih sredstev, ki se navezujejo na celični cikel in uničujejo rakaste celice.

Poskusi na živalih so poleg pozitivnih učinkov za človeka doprinesli veliko novih odkritij tudi veterinarski stroki. Terapija za marsikatero bolezen pri živalih – steklino, vranični prisad, smrkavost (konji), FIV, tuberkulozo, klasično prašičjo kugo, parazita dirofilarijo ter nekatere druge bolezni in parazitarne infekcije – je mogoča zaradi predhodnih raziskav na živalskih modelih.

Kljub temu da so nekateri znanstveniki za svoje delo (za katerega so rezultate pridobili s pomočjo poskusov na živalih) dobili Nobelovo nagrado in da morda obstaja še več poskusov, ki imajo strokovno podlago za Nobelovo nagrado, to ne pomeni, da se niso držali ali pa se jim ni bilo potrebno držati določil zakonodaje na področju poskusov na živalih. Vsako neupoštevanje veljavne zakonodaje se šteje za mučenje in je kaznivo.

VRSTE ŽIVALI V POSKUSIH

V naši veljavni zakonodaji je opredeljeno, na katerih živalskih vrstah je sploh dovoljeno izvajanje poskusov. Večina poskusov se opravi na glodavcih, predvsem miših in podganah, ki predstavljajo večino laboratorijskih živali, kar lahko vidimo tudi v vedno višjem številu genetsko spremenjenih miši.

V poskusih se uporabljajo tudi netradicionalne poskusne živali, za katere na splošno velja in je tudi zapisano v zakonodaji, da se za poskuse ne uporabljajo. Uporaba je dovoljena le v izjemnih primerih. Eden takšnih primerov je pasavec. Pasavec je žival, ki živi v Južni Ameriki in je dovzeten za vrsto mikobakterije, ki pri človeku povzroča gobavost. Živali lahko služijo kot vir okužbe ali pa za ugotavljanje mehanizmov patogeneze in potencialne terapije.

Činčila, glodavec, ki izhaja iz Južne Amerike in je zanimiv zaradi svojega kožuščka za krznarsko industrijo, ima zelo dostopen slušni organ, zaradi česar so jih uporabljali za študij osnovnih mehanizmov zaznave zvoka in določanje, ali so nekateri faktorji toksični za sluh in ali na kateri drugi način vplivajo na sluh. Sistem zaznave zvoka je podoben kot pri človeku. Dihurji, ki so tudi vedno bolj pogosti domači ljubljenci, so bili pomembni pri študiju gripe, ki še vedno predstavlja veliko grožnjo človeštvu. Razvoj vakcine je odvisen od občutljivosti gostitelja in dihur je primerno občutljiv gostitelj.

Med primere nekonvencionalne uporabe živali v poskusne namene uvrščamo še ribice cebrice, žabo *Xenopus* in vinsko mušico. V zadnjih letih se je uporaba rib, večinoma cebric, kot poskusnih živalih povečala. Zanimive so za genetske študije bolezni, ki se pojavljajo pri ljudeh in drugih sesalcih. Uporabljajo se tudi za študij kemične mutageneze in karcinogeneze, pri čemer pomagajo napredki pri študiju genomike rib. Žabe *Xenopus* so bile pomembne pri pridobivanju podatkov iz embriogeneze, zgodnjega razvoja in faktorjev, ki vplivajo na te parametre. Embrii so zelo dostopni kirurški in kemični manipulaciji. Delo na vinski mušici *Drosophila melanogaster* traja že več let in je veliko doprineslo na področju živalske genetike. Stroški raziskav so nizki in v raziskavah se je lahko uporabilo večje število živali.

V zadnjih desetletjih so se raziskave na psih in mačkah bistveno zmanjšale. Raziskave, ki se ukvarjajo s temeljnimi biološkimi vprašanji, se večinoma izvajajo na glodavcih. Širša javnost ima vedno večje pomisleke glede uporabe psov in mačk v raziskovalne namene. Vsemu navkljub je potrebno omeniti, da so psi in mačke (in njihovi lastniki) veliko pridobili na podlagi raziskav, ki so bile narejene z namenom izboljšanja človeškega zdravja.

Javnost in znanstveniki imajo tudi vedno večje predsodke do raziskav na nečloveških primatih. Veliko tehnologij zdravljenja in terapevtskih sredstev je bilo razvitih za potrebe humane medicine, pa vendar so zelo pomembne tudi za veterinarsko medicino, ki še posebej v času razvoja ni imela tolikšnih finančnih zmožnosti za razvoj zdravil kot medicina. Nečloveške primare so uporabljali pri študiju eradikacije otroške paralize, na njih so proučevali patogenezo bolezni in učinkovitost kandidatnih vakcin (opice *Rhesus*), vakcine proti virusu, ki povzroča AIDS (opice *Rhesus*), za študij različnih tipov virusnega hepatitisa (B in C) pri človeku (šimpanzi), nevrobiološke študije na področju zaznavanja, obnašanja in za bazične nevrološke študije, ki so pomagale razjasniti učinke različnega zdravljenja na

različne dele človeških možganov, ter za študije odvisnosti od nekaterih substanc in ugotavljanje mehanizmov odvisnosti.

GENETSKO SPREMENJENE ŽIVALI V POSKUSIH

Razvoj genetsko spremenjenih mišk je eden najpomembnejših dosežkov s področja biomedicinskih raziskav in poskusov na laboratorijskih živalih. V kombinaciji z razvozlanim humanim in živalskim genetskim kodom predstavlja osrednjo vlogo pri razumevanju bolezni, ki so povezane z genetskimi informacijami. Razumevanje doprinosa genov pri nastanku bolezni bi lahko pomagalo tudi pri identifikaciji bolezni, lahko bi pozitivno vplivalo na preventivo, postavljanje prognoze in terapijo ter razvoj novih terapij. Priprava genetsko spremenjenih mišk je bistveno bližji korak k pridobivanju modela za proučevanje humane bolezni. Možno je spremljati bolezni, ki so vezane na en gen ali več genov. Zaradi velike podobnosti med genetskim zapisom mišk in človeka so modeli smiselni. S študijem funkcije genov pri živalskih modelih je mogoče pridobiti informacije o genih pri človeku. Podatki, pridobljeni pri raziskavah na takšnih laboratorijskih miškah in tudi pri drugih živalskih vrstah, bodo pomagali pridobiti podatke o funkciji homolognih genov in s tem zbrati koristne informacije za zdravljenje nekaterih bolezni.

Najpomembnejši od modelov genetsko spremenjenih mišk so:

- model mišk z izbitimi geni za humano cistično fibrozo (CF) ledvic nosijo mutacije v genu, ki kodira transmembranski regulator cistične fibroze (CFRT);
- aterosklerotični model mišk – raziskave na področju ateroskleroze in podobnih bolezni. Apo E3 transgene miške izražajo nefunkcionalno humano apo E varianto apolipoproteina. Miši razvijejo hiperlipidemijo in aterosklerozo, če so podvržene dieti z veliko maščob in/ali holesterola. Raven holesterola v plazmi se poviša in na aortah se pojavijo aterosklerotične bolezni, ki so podobne humanim boleznim in so zato zelo dragocen živalski model za študij genetskih vplivov, razvoja in terapije ateroskleroze;
- glodavski modeli z mutacijami p53 – pomembni pri študiju tumorogeneze. Obstaja več mišjih linij, ki nosijo mutanto p53 transgena.

Poleg transgenih mišk obstajajo še transgene ovce in koze. Pri njih so transgeni vstavljeni večinoma naključno. Primer vključitve specifičnega transgena v specifični lokus je humani gen za alpha1-tripsin – nekatere živali so proizvedle večje količine humanega proteina v mleku. Namen je bil proizvodnja in prečiščenje proteina iz mleka.

Drugi primer so transgeni piščanci, ki so bili zanimivi, ker rastejo hitreje kot ovce in koze in v beljaku proizvedejo večjo količino beljakovine. Z dvema metodama so uspeli vnesti tuje gene v piščance – z inficiranjem piščancev z virusnim vektorjem, ki nosi humani gen za terapevtski protein ali pa promotorske sekvence, ki vplivajo na proizvodnjo proteina, ali pa s transformacijo petelinove sperme s humanim genom in primernimi promotorji ter naknadnim testiranjem potomstva na izražanje transgena. Piščanci bi lahko bili boljša alternativa proizvodnji s pomočjo *E. coli*, ker lahko proteinom dodajo še glikolizirane sladkorje.

Za proizvodnjo organov, ki bi lahko koristili za transplantacijo pri človeku, so proizvedli tudi transgene prašiče s pomočjo fertilizacije normalnega jajčeca s spermiji, ki vsebujejo spremenjeno DNA, t. i. sperm mediated gene transfer (SMGT).

28. maja 2009 so japonski znanstveniki v reviji *Nature* objavili stvaritev transgenih opic marmozetk, ki jih uvrščamo med opice novega sveta, ki so nam najbolj sorodne. Namen je bil dobiti najbližji model za študij humanih bolezni.

ALTERNATIVE ŽIVALIM, KI SO UPORABLJENE V POSKUSNE NAMENE

Obstajajo tudi alternative poskusov na živalih, kot je uporaba neživalskih modelnih organizmov, npr. rastlin iz družine *Arabidopsis thaliana*, ki nima pomena za kmetijstvo in je pomembna z vidika bazičnih genetskih, molekularnih in bioloških raziskav. Pozitivna lastnost je mali genom in samo pet kromosomov, genetski kod je poznan in prav tako večje število mutantnih linij, poleg tega pa ima tudi

krajši življenjski cikel. Druga alternativa so celične kulture, računalniški modeli, fiziološke in patološke simulacije ipd.

EMBRIONALNE MATIČNE CELICE GLODAVCEV

Na področju raziskav, ki temeljijo na poskusnih živalih, so se razvile nove tehnologije, ki znanstvenikom omogočajo, da gojijo embrionalne matične celice v kulturi. Pri sesalcih so oplojene jajčne celice in 4- in 8-celične blastomere totipotentne in se lahko razvijejo v celoten osebek. Na tem postopku temelji tudi tarčna genska tehnologija, ki se je poslužujejo za pripravo živali (mišk) z izbitimi geni ali pa s čezmernim izražanjem genov. Transgene živali so pripravljene na način, da se vnese novi gen, ki ga imenujemo transgen, v prejemniški živalski embrio. Alternativna rešitev je neposredna mutageneza genoma transgene živali z usmerjenimi postopki, s katerimi pridobimo žival z izbitimi geni, ali pa uporaba spontanah mutacij pri živalih, ki služijo kot modeli bolezni oz. določenih pogojev. Pri teh metodah so najpomembnejše miške, postopki pa se širijo tudi na druge živalske vrste.

POMEMBNA ZDRUŽENJA IN PRIZADEVANJA ZA ZAŠČITO ŽIVALI V POSKUSNE NAMENE

V okviru znanosti za laboratorijske živali se ustanavlja veliko združenj, ki pomagajo pri izboljševanju kvalitete poskusov in skrbijo za dobro počutje živali. Leta 1875 je bila v Veliki Britaniji ustanovljena prva antivivisekcijska organizacija (The Victoria Street Society). Pomembno in vodilno evropsko združenje je bilo v Evropi ustanovljeno leta 1978 in se imenuje FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) – <http://www.felasa.eu/>. Združenje FELASA je v leta 1995 in leta 2000 pripravilo in objavilo priporočila za izobraževanje in usposabljanje osebja. Zasnovali so sistem akreditacije tečajev usposabljanja, ki se jih držimo. Poleg krovnega evropskega združenja pa so v Evropi ustanovljene še številne regionalne in državne organizacije. V ZDA je bila že leta 1950 ustanovljena organizacija AALAS (American Association for Laboratory Animal Science). Na svetovni ravni pa vse organizacije združuje in povezuje že leta 1956 ustanovljena organizacija ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science). Leta 1991 je bila na podlagi Direktive 86/609/EEC ustanovljena organizacija ECVAM (the European Centre for the Validation of Alternative Methods), ki je vodilni center v EU za koordinacijo zakonitve alternativnih metod na področju biomedicine – <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.

NAČELO »3R«

William M. S. Russell in Rex L. Burch sta leta 1959 objavila knjigo z naslovom *The principles of human experimental technique*, v kateri sta zasnovala načela, ki jih danes poznamo pod izrazom načelo »3R«: REPLACEMENT (zamenjava), REDUCTION (zmanjševanje števila živih živali) in REFINEMENT (izboljšanje). To so tudi temeljna načela, ki se jih držimo v naših raziskavah. V knjigi sta opisala, kako se koncept 3R uporablja pri zmanjševanju ali pa celo prenehanju poskusov na živalih. Zaključila sta, da je zamenjava vedno zadovoljiv odgovor, zmanjševanje števila živih živali in izboljšanje pa naj se vedno uporabljata skupaj.

Pri zamenjavi gre za uporabo alternativne metode, ki bi dala enak rezultat brez uporabe živali. Če takšna alternativa ne obstaja, se poskušamo osredotočiti na filogenetsko »nižje« razvito vrsto. Z zmanjševanjem števila živih živali želimo zmanjšati število živali, ki se uporabljajo v študiji, brez da s tem vplivamo na rezultat poskusa, ali pa izberemo poskus, pri katerem potrebujemo manjše število živali. Pri izboljšanju pa mislimo na izboljšanje pogojev bivanja živali in skrb za dobrobit živali (zmanjševanje bolečine, skrb za okolje ipd.).

ZAKLJUČEK

Z razvojem novih metod v medicinskih raziskavah so se pojavili tudi novi načini boja z nekaterimi boleznimi. Mnogo raziskav lahko izvedemo *in vitro*, izven živalskega telesa, še posebej napredne metode na celičnih kulturah in molekularne biološke metode. Številni raziskovalci uporabljajo *in vitro* tehnike, ki jim pomagajo razumeti, kako celica in njene znotrajcelične komponente delujejo, kako celica, njena membrana in receptorji reagirajo na druge celice in kemikalije ali pa kako zunanji faktorji vplivajo na njihov metabolizem in rast. Kljub vsemu pa znanstveniki poskušajo razumeti, kako ti koščki pridobljenega znanja oblikujejo večjo sliko in kako deluje živalski organizem kot celota. Zaradi tega razloga bodo živali, kot so bile v preteklosti, ostale pomemben sestavni del biomedicinskih raziskav in bodo zelo močno doprinesle tudi k bodočim biomedicinskim raziskavam in napredkom.

Da bo uspeh pri biomedicinskih raziskavah zagotovljen, je izrednega pomena izobraževanje in vzgajanje mladih znanstvenikov z različnih področij, ne samo iz strokovnosti njihovega dela, marveč tudi s področja pravičnega dela z laboratorijskimi živalmi.

Pomembno je tudi postaviti primerne baze z dobro dostopnostjo, ki bodo shranjevale vse pomembne podatke in hkrati onemogočale odvečno podvajanje poskusov in omogočale kvalitetno medsebojno sodelovanje.

LITERATURA

1. Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
2. Hau J, van Hoosier GL, eds. Handbook of laboratory animal science. Vol.1: Essential principles and practices. 2nd ed. Boca raton: CRC Press, 2003.
3. van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of laboratory animal science: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of results. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2001.
4. Nevalainen T, Hau J, Sarvihaju M, eds. Frontiers in laboratory animal science. Proceedings of joint international conference ICLAS, Scand-LAS and FinLAS. Scand J Lab Animal Sci 1996; 23 (Suppl 1).
5. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. Rev Sci Tech 2005; 24: 503–14.
6. ATLA. Alternatives to laboratory animals. In: Third World Congress on Alternatives and Animal Use in Life Sciences. Bologna, 1999.
7. Balls M, van Zellen AM, Halder M, eds. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: Elsevier, 2000.

UVOD

V Evropi so poskusi na živalih deležni posebno konfliktne in poudarjene zakonodajne zaščite, kar je posledica močnih socialnih gibanj v 60. in 70. letih prejšnjega stoletja. Pomemben mejnik predstavljata leta 1986 sprejeta Evropska konvencija Sveta Evrope o zaščiti živali, ki se uporabljajo v poskusne in druge znanstvene namene, ter nekoliko kasneje sprejeta smernica Evropske unije 86/609/EEC, ki se vsebinsko bistveno ne razlikuje od evropske konvencije. Njen cilj je bil zagotoviti, da se določbe o zaščiti poskusnih živali v nacionalnih določbah držav članic uskladijo, s tem pa prepreči neenaka konkurenca in ovire za trgovanje. Vendar so države članice Evropske unije (EU) smernico različno prenesle v svoj pravni red. Nekatere so sprejele obsežnejše določbe v nacionalnih zakonodajah, medtem ko so druge sprejele le minimalne zahteve. Z namenom zvečanja zaščite živali in zahteve po spoštovanju živali kot čutečih bitij, ki je temeljno načelo in izhaja iz ustanovne pogodbe o delovanju EU, je Evropska komisija leta 2006 sprejela Akcijski načrt o zaščiti in dobrem počutju živali. V njem so poleg ostalih živali vključene tudi poskusne živali. V skladu z njim je pripravila revizijo Direktive 86/609/EEC in septembra 2010 v soddločanju z Evropskim parlamentom sprejela Direktivo 2010/63/EU. Direktivo morajo države članice prenesti v nacionalne zakonodaje in jo začeti uporabljati z letom 2013.

PREGLED SLOVENSKE ZAKONODAJE O ZAŠČITI POSKUSNIH ŽIVALI

Prva določila o zaščiti poskusnih živali v Republiki Sloveniji so bila zapisana v Navodilu o pogojih za izdajo dovoljenja za poskuse na živalih v znanstvenoraziskovalne namene iz leta 1985. Navodilo je že takrat določalo pridobivanje dovoljenj za izvajanje poskusov na živalih, imenovanje nadzornika, vodje in izvajalcev poskusov v dovoljenju ter vodenje evidenc. Kljub jasnim določilom je bil nadzor slab in neučinkovit, sankcije za kršitelje pa zelo nizke.

Področje zaščite poskusnih živali se je začelo urejati z uveljavitvijo Zakona o zaščiti živali konec leta 1999. Zakon velja za vse živali, ki imajo razvita čutila za sprejem zunanjih dražljajev in razvit živčni sistem, da boleče zunanje vplive čutijo, in se dosledno izvaja pri vretenčarjih, pri drugih živalih pa glede na stopnjo njihove občutljivosti v skladu z ustaljenimi izkušnjami ter znanstvenimi spoznanji. Določa odgovornost ljudi za zaščito živali, to je zaščito njihovega življenja, zdravja in dobrega počutja. Zakon je bil podlaga za sprejetje podzakonskih aktov, s katerimi se je podrobneje uredilo področje zaščite poskusnih živali.

V letu 2000 sta bila sprejeta dva pravilnika. Najprej je bil sprejet pravilnik, ki ureja naloge in dolžnosti strokovnega sveta za zaščito živali. Njegova naloga je med drugim tudi, da sodeluje pri pripravi predpisov o zaščiti poskusnih živali in predlaga kriterije za izdajo dovoljenj za poskuse na živalih. Sledil je pravilnik o etični komisiji za poskuse na živalih. Etična komisija je strokovni svetovni organ pri Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Sestavlja jo devet priznanih strokovnjakov veterinarske, medicinske, biološke, farmacevtske in zootehnične stroke. Njena naloga je, da proučuje in podaja strokovna mnenja o upravičenosti uporabe živali v poskusih. Prav tako sodeluje pri pripravi predpisov o zaščiti živali v poskusih ter daje mnenja in opredelitve do posameznih etičnih vprašanj.

Evropska določila za zaščito poskusnih živali so bila vključena v pravilnik šele leta 2004 ob vstopu Republike Slovenije v EU. Ker je bil predpis pomanjkljiv, ga je dve leti kasneje zamenjal Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih, ki natančneje povzema Direktivo 86/609/EEC. Vključuje tudi pogoje o zagotavljanju zdravstvenega varstva živali za vzrejne organizacije iz Direktive 92/65/EEC, ki ureja področje trgovanja in uvoza. Pravilnik vsebuje šest poglavij: splošne določbe, pogoje za organizacije, pogoje za izvajanje poskusov na živalih, pogoje oskrbe in nastanitve živali, evidence ter prehodne in končne določbe. Sestavni del omenjenega pravilnika so priloge: Priloga 1 o

nastanitvi in oskrbi poskusnih živali, Priloga 2 o spremljanju zdravstvenega stanja živali v vzrejnih organizacijah, Priloga 3 o programu usposabljanja oseb, ki delajo s poskusnimi živalmi, Priloga 4 o obrazcu vloge za izdajo dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih in Priloga 5 s preglednicami za letno poročanje o vrsti in številu uporabljenih poskusnih živali ter namenu uporabe. Z zadnjo spremembo pravilnika je bilo določeno upoštevanje priporočila Komisije 2007/526/EC pri nastanitvi in oskrbi tistih živalskih vrst, ki jih Priloga 1 pravilnika ne pokriva. V priporočilu so poleg splošnih pravil natančneje določeni bivalni pogoji za posamezne živalske vrste. Priporočilo poleg smernic za laboratorijske glodavce vsebuje tudi smernice za primata razen človeka, živali, ki se sicer vzrejajo v rejne namene, pa se uporabljajo v poskusih, ptice, dvoživke, plazilce in ribe.

V Republiki Sloveniji so vzporedno s harmonizacijo zakonodaje potekale tudi aktivnosti v postopku sprejemanja evropske konvencije. Končno je bil leta 2006 sprejet Zakon o ratifikaciji Evropske konvencije za zaščito vretenčarjev, ki se uporabljajo v poskusne in druge znanstvene namene. S podpisom se je država obvezala, da bo uresničevala ukrepe, navedene v konvenciji, in zagotavljala učinkovit sistem nadzora.

V zadnji spremembi Zakona o zaščiti živali je urejeno znanstvenoraziskovalno ali izobraževalno delo na izoliranih organih, tkivih in truplih predhodno usmrčenih živali. S Pravilnikom o načinih usmrčitve poskusnih živali, v katerem so upoštevana priporočila o evtanaziji poskusnih živali, ki jih je pripravila skupina strokovnjakov, so bili predpisani tudi pogoji za opravljanje dela na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali.

Pod določenimi pogoji in z dovoljenjem VURS je mogoče v znanstvenoraziskovalne in izobraževalne namene uporabljati tudi živalska tkiva in organe, ki izvirajo od zdravih živali iz rednega zakola v klavnicah, kar je v skladu z Uredbo (EC) 1069/2009, ki podrobneje določa odstranjevanje živalskih trupel. Z omenjeno uredbo ter izvedbenimi predpisi in predpisom vlade, ki ureja medsebojno sodelovanje pristojnih organov, je predpisano varno odstranjevanje živalskih stranskih proizvodov (ŽSP) in ravnanje z njimi, da se zavaruje zdravje ljudi in živali.

Vzrejne, dobaviteljske in uporabniške organizacije ter pogoji odobritve

Organizacije, ki vzrejajo živali za uporabo v poskusih, dobavljajo in uporabljajo poskusne živali, morajo biti odobrene. Pogoji zanje so predpisani v Zakonu o zaščiti živali in Pravilniku o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Izpolnjevanje pogojev preverja VURS v postopku odobritve, ki se začne na zahtevo organizacije. Na podlagi vloge imenuje direktor VURS strokovno komisijo, ki opravi pregled prostorov in opreme, preveri pogoje oskrbe in nastanitve poskusnih živali, kadrovske pogoje ter vodenje evidenc oziroma preveri, ali organizacija izpolnjuje predpisane pogoje za vzrejo laboratorijskih živali ali dobavo ali izvajanje poskusov na živalih. Pri pregledu sestavi zapisnik in izda mnenje. Na podlagi pozitivnega mnenja komisije o izpolnjevanju pogojev direktor VURS izda odločbo o odobritvi organizacije in jo vpiše v register. Pri manjših pomanjkljivostih izda ureditveno odločbo in začasno odločbo o odobritvi, pri večjih nepravilnostih pa zahtevke za odobritev zavrne.

Vse organizacije, tudi dobaviteljske, če so živali v njih nastanjene, morajo:

- a) izpolnjevati pogoje glede prostorov, opreme in tehničnih pripomočkov za nastanitev in oskrbo živali v skladu s Prilogo 1 pravilnika in priporočilom Komisije 2007/527/EC;
- b) izpolnjevati kadrovske pogoje v skladu s členom 5 pravilnika;
- c) imeti zagotovljeno zdravstveno varstvo živali v skladu s Prilogo 2 pravilnika;
- d) imeti ustrezno opremo za usmrnitev živali v skladu s Pravilnikom o načinih usmrčitve poskusnih živali;
- e) imeti ustrezno zamrzovalno skrinjo v primeru začasnega skladiščenja živalskih trupel;
- f) imeti zagotovljeno predpisano odstranjevanje trupel poskusnih živali;
- g) imeti ustrezno dokumentacijo in predpisane evidence.

Vzrejna organizacija je pravna ali fizična oseba, ki vzreja ali redi laboratorijske živali. Poleg zgoraj navedenih pogojev mora imeti še zagotovljeno izvajanje patomorfoloških preiskav in izpolnjevati predpisane pogoje glede prevoza živali, če sama izvaja njihov prevoz. Če goji gensko spremenjene organizme (GSO), mora biti vpisana tudi v Register GSO pri Ministrstvu za okolje in prostor (MOP). Dobaviteljska organizacija je pravna ali fizična oseba, ki izključno dobavlja poskusne živali in ni vzrejna organizacija.

Uporabniška organizacija je pravna oseba, v kateri se živali uporabljajo za poskuse. Poleg že omenjenih pogojev reje in oskrbe mora imeti tudi primerne naprave in opremo za izvajanje poskusov. Oblika,

izvedba in delovanje takih naprav ter opreme morajo zagotavljati učinkovito izvajanje poskusov za doseganje skladnih rezultatov z najmanjšim številom živali ter najmanjšo stopnjo bolečine, trpljenja ali trajnih poškodb. Znanstvenoraziskovalno delo raziskovalnih organizacij urejajo predpisi o raziskovalni dejavnosti. Če organizacija pri raziskavah dela z GSO ali živalskimi vrstami, odvzetimi iz narave, potrebuje posebno dovoljenje MOP v skladu z Zakonom o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi ali Zakonom o ohranjanju narave. Posebne omejitve veljajo za zaščitene prostoživeče živalske vrste.

Kadrovski pogoji

Kadrovski pogoji za osebe, ki delajo s poskusnimi živalmi, so določeni v členu 5 Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih.

Oskrbovalci živali, ki so zadolženi za oskrbo in nastanitev živali, morajo imeti vsaj srednješolsko izobrazbo in zaključeno usposabljanje za oskrbovalce, ki traja najmanj 30 ur. Izvajalci poskusov na živalih morajo imeti dokončan študij medicine, veterinarske medicine, biologije ali zootehnike in zaključeno usposabljanje za izvajalce poskusov, ki traja najmanj 40 ur. V posebej utemeljenih primerih, ko narava poskusa to zahteva, lahko v poskusu sodeluje tudi oseba z drugačno izobrazbo, če ima zadostno strokovno znanje in zaključeno usposabljanje za izvajalce poskusa, vendar le pod vodstvom osebe z dokončanim študijem medicine, veterinarske medicine, biologije ali zootehnike.

Vodje poskusov, ki načrtujejo in vodijo poskuse na živalih, morajo imeti dokončan študij medicine, veterinarske medicine, biologije ali zootehnike in zaključeno usposabljanje za vodje poskusov, ki traja najmanj 60 ur.

Strokovnjak za zaščito živali, ki nadzira oskrbo in izvajanje poskusov na živalih znotraj uporabniške organizacije, mora imeti dokončan študij medicine, veterinarske medicine, biologije ali zootehnike in zaključeno usposabljanje za strokovnjaka za zaščito živali, ki traja najmanj 60 ur. Strokovnjaka za zaščito živali imenuje uporabniška organizacija, ki izvaja poskuse na vretenčarjih. V dokumentu o imenovanju navede njegovo strokovno usposobljenost, položaj in pooblastila, ki jih ima za zaščito živali. Njegova naloga je tudi, da pregleda vloge za izdajo dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih in napiše obrazložitev za odobritev poskusa.

Oseba, ki izvaja usmrnitev živali, mora imeti najmanj srednješolsko izobrazbo in potrebno znanje, spretnosti in sposobnosti za humano in učinkovito opravljanje teh nalog, ki jih pridobi z usposabljanjem.

Usposabljanje se izvaja na tečajih v obliki predavanj in praktičnih prikazov po programih, ki jih odobri VURS. Programi usposabljanja morajo obsegati predpisane vsebine iz Priloge 3 pravilnika.

Če je oseba pridobila znanje s področja poskusnih oziroma laboratorijskih živali v okviru izobraževanja v visokošolskih zavodih v Republiki Sloveniji ali drugi državi članici EU, lahko VURS na njen predlog v določenem obsegu prizna opravljeno usposabljanje.

Opredelitev poskusa na živali

Poskus na živali pomeni uporabo živali v poskusne ali druge znanstvene namene, ki ji lahko povzroči bolečino, trpljenje, stisko ali trajne poškodbe. V poskus so vključeni tudi drugi ukrepi, ki povzročijo ali lahko povzročijo rojstvo živali v navedenih okoliščinah. Za poskus ne štejejo najmanj boleče metode usmrnitve ali označevanje živali. Poskus se začne, ko je žival prvič pripravljena za uporabo v poskusu, in se konča, ko nadaljnje opazovanje ni več potrebno. Za poskus šteje uporaba živali tudi v primerih, ko se z anestetiki, analgetiki ali z drugimi metodami preprečujejo njeno trpljenje, stiska ali trajne poškodbe.

Dovoljeni nameni uporabe živali v poskusih

Dovoljene namene uporabe živali v poskusih določa Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Poskuse na živalih smejo izvajati le organizacije, ki so odobrene za izvajanje takih poskusov in imajo dovoljenje VURS. Če pri iskanju rezultatov ni na voljo drugih zadovoljivih znanstvenih metod, ki ne zahtevajo uporabe živali v poskusih, je živali dovoljeno uporabljati za naslednje namene: razvoj, izdelava, preskušanje kakovosti, učinkovitosti in varnosti zdravil, živil in drugih snovi ali izdelkov, izogibanje, preprečevanje, diagnosticiranje ali zdravljenje bolezni, oslabelosti organizma in drugih

odstopanj ali njihovih učinkov na ljudi, živali ali rastline ter presojo, odkrivanje, urejanje ali spreminjanje fizioloških stanj pri ljudeh, živalih ali rastlinah. Nadalje je dovoljeno uporabljati živali v temeljnih raziskavah, za izvajanje poskusov z namenom zaščite okolja ter v omejenem obsegu za izobraževanje in usposabljanje.

Zakon o zaščiti živali prepoveduje poskuse na živalih z razvitim živčnim sistemom za zaznavanje bolečin v izobraževalne namene. VURS lahko dovoli take poskuse, če se izvajajo v visokošolskih zavodih po predpisih, ki urejajo visoko šolstvo, ali v raziskovalnih organizacijah po predpisih, ki urejajo raziskovalno dejavnost, in so nujni za pridobitev znanj, ki jih pri svojem delu potrebujejo zdravniki pri posegih na ljudeh ali veterinarji pri posegih na živalih, in če ciljev poskusov ni mogoče doseči s pomočjo drugih učnih pripomočkov (film, slika, modeli, preparati ipd.).

Postopek pridobivanja dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih

Pristojni upravni organ za izdajo dovoljenj za izvajanje poskusov na živalih je VURS. Dovoljenja se izdajajo v upravnem postopku na zahtevo stranke. Stranka v postopku je lahko le uporabniška organizacija. Vodja poskusa pripravi vlogo za izdajo dovoljenja za izvajanje poskusa ali serije poskusov na živalih na predpisanem obrazcu. Vlogo pregleda strokovnjak za zaščito živali in pripravi obrazložitev za odobritev poskusa. Poleg ostalih navedb na vlogi morajo vodja in izvajalci podpisati tudi izjavo, da imajo predpisano izobrazbo, izkušnje in usposobljenost, da bodo poskuse izvedli v skladu s predpisi in bodo za poskusne živali ustrezno poskrbeli.

V primeru načrtovane uporabe prostoživečih živali v poskusu je potrebno k vlogi priložiti dovoljenje MOP, ARSO, v primeru načrtovane uporabe divjadi pa dovoljenje MKGP. V skladu z zakonom o upravnih taksah je potrebno plačati tudi upravno takso.

VURS lahko pred odločitvijo zaprosi etično komisijo za poskuse na živalih, da poda mnenje.

Etična komisija pri obravnavi vlog upošteva načelo 3R. Ime načela izvira iz začetnic angleških besed, njegove osnove pa izvirajo že iz leta 1959. Načela slovenska zakonodaja izrecno ne omenja, vendar je vključeno v nekaterih določbah:

- a) replacement ali zamenjava živali: poskus na živalih se ne sme izvajati, če je sprejemljiva in izvedljiva druga znanstveno zadovoljiva in uveljavljena metoda brez uporabe živali;
- b) reduction ali zmanjšanje števila živali: poskus se mora izvesti z najmanjšim možnim številom živali;
- c) refinement ali izboljšanje nastanitvenih pogojev, oskrbe živali in izvedbe poskusa: poskus se mora izvesti na živalih z najnižjo nevrofiziološko občutljivostjo in z metodo, ki povzroča najmanj trpljenja, bolečin in trajnih poškodb. Žival se pred pričetkom poskusa anestezira, razen če je bolečina, ki bo povzročena s poskusom, manjša od bolečine, povzročene z anestezijo, ali če bi bila anestezija v nasprotju z namenom poskusa. Če anestezija ni mogoča, se morajo uporabiti analgetiki, ki živalim preprečijo ali lajšajo trpljenje in stisko, ki nastaneta med poskusom. Ko anestezija pri živali preneha delovati, mora biti žival zdravljena s sredstvi za blažitev bolečin, če je to združljivo s ciljem poskusa, oziroma biti usmrčena po humani metodi, če to ni mogoče. Oskrbovalec živali mora nadzorovati zdravstveno stanje in dobro počutje živali ter poskrbeti, da vsako odkrito napako ali stisko živali pri nastanitvi in oskrbi živali nemudoma odpravi. Osebe za nego in oskrbo živali, vodenje in izvajanje poskusov mora imeti ustrezno izobrazbo in usposobljenost.

Ob upoštevanju mnenja etične komisije VURS popolno vlogo preuči in odloči v upravnem postopku. Če je poskus nujno potreben in utemeljen, izda dovoljenje, vendar za točno določen poskus ali serijo poskusov in omejen čas, v njem pa poimensko navede vse osebe, ki so udeležene pri poskusih. V dovoljenju med drugim navede tudi namen uporabe živali ter podatke o živalih, kot so vrsta, število in izvor živali. Izrek dovoljenja vsebuje pogoje, pod katerimi je dovoljeno izvesti poskus. Nekateri od teh pogojev so naslednji: živalim je treba zagotoviti ustrezno bivališče, hrano, vodo in oskrbo; vsak dan se morajo preveriti pogoji oskrbe in nastanitve živali; živali ali kletke morajo biti označene, poskus se mora izvesti z najmanjšim možnim številom živali z najnižjo nevrofiziološko občutljivostjo in metodo, ki povzroča najmanj trpljenja, bolečin in trajnih poškodb; boleči posegi se morajo izvesti ob uporabi anestezije oz. sredstev za lajšanje bolečin in pomirjanje živali; trupla poskusnih živali se morajo odstraniti na predpisan način; o vseh opravilih se morajo voditi evidence. Poskusov na živalih ni

dovoljeno izvesti, če se ugotovi, da obstaja sprejemljiva in izvedljiva druga znanstveno zadovoljiva in uveljavljena metoda brez uporabe živali.

Poskuse na rejnih živalih, psih in mačkah je dovoljeno izvajati le, če se s poskusom na drugih živalskih vrstah ne more doseči namena poskusa. VURS lahko v izjemnih primerih, ko je poskus nujen za ohranitev živalske vrste, žival pa edina primerna za poskus ali je ni mogoče vzrediti, izda dovoljenje za poskuse, tudi če žival ne prihaja iz organizirane in registrirane reje. Poskusi na zapuščenih živalih so prepovedani. Prav tako so prepovedani poskusi na prostoživečih živalih, razen če poskusi na drugih živalih ne zadostujejo namenu poskusa. Poskusi na živalih ogroženih vrst so prepovedani, razen če je namen poskusa raziskava, katere cilj je ohranitev zadevne ogrožene živalske vrste, ali pa gre za bistvene biomedicinske raziskave, ko se zadevna ogrožena živalska vrsta izkaže kot edina primerna.

Prepovedani poskusi na živalih

Prepovedano je izvajanje poskusov za etično nesprejemljive cilje, kot so preskušanje bojnih sredstev, kozmetičnih preparatov, tobačnih ali alkoholnih izdelkov, ali za poskuse, pri katerih se uporabljajo sredstva za hromljenje mišic in ki se izvajajo brez anestezije.

Tudi Zakon o kozmetičnih proizvodih določa, da v Republiki Sloveniji ni dovoljeno preskušanje kozmetičnih proizvodov ali njihovih prototipov na živalih.

Vodenje evidenc in ostale dokumentacije v organizacijah

Evidence, ki jih morajo voditi v organizacijah, so predpisane, prav tako vsa ostala potrebna dokumentacija. Vsaka organizacija mora imeti program čiščenja in navodila za čiščenje prostorov in opreme (kletke, krmilniki, korita, steklenice). O čiščenju in razkuževanju prostorov in opreme ter po potrebi sterilizacije mora voditi evidenco. Prav tako mora voditi evidenco o dnevnem preverjanju temperature in vlažnosti (dan, ura, vrednost, podpis osebe, ki opravi meritve). Po potrebi mora nadzorovati jakost osvetlitve in ciklus svetloba-tema v prostorih z živalmi. Na kletkah morajo biti oznake s podatki o živalski vrsti, številu, starosti, času nastanitve in namenu nastanitve.

Poleg evidenc o oskrbi živali so obvezne evidence o nabavi, vzreji, prodaji, uporabi živali in odstranjevanju trupel ter živalskih tkiv poskusnih živali.

Evidence, ki so jih o vzreji živali, nabavi ter prodaji dolžne voditi vzrejne organizacije in jih hraniti najmanj 10 let, so naslednje:

- evidenca o vzreji živali s podatki o generaciji živali, živalski vrsti, spolu, oznaki, številu, datumu rojstva, morebitnem poginu živali oziroma usmrtnosti živali;
- evidenca o nabavi živali s podatki o živalski vrsti, spolu, starosti, oznaki, zdravstvenem stanju, številu nabavljenih živali, datumu nabave in dobavitelju;
- evidenca o prodaji živali s podatki o živalski vrsti, spolu, starosti, oznaki, zdravstvenem stanju in številu prodanih živali, datumu prodaje in kupcu;
- evidenca o rezultatih krvnih preiskav in drugih diagnostičnih postopkih s podatki o živalski vrsti in oznaki živali, datumu preiskave, vrsti vzorca, diagnostičnem postopku ter rezultatu in številki izvida;
- evidenca o primerih bolezni in uporabljenem zdravljenju;
- evidenca o patomorfoloških rezultatih pregledov živali, ki so poginile v organizaciji, vključno z mrtvorojenimi živalmi;
- evidenca o opažanjih v času izolacije ali karantene živali.

Evidence, ki so jih o nabavi in prodaji živali dolžne voditi dobaviteljske organizacije ter jih hraniti najmanj 5 let, vsebujejo enake podatke kot evidence, ki jih o nabavi in prodaji živali ter opažanjih na živalih, če so živali v njih nastanjene, vodijo vzrejne organizacije.

Evidence, ki so jih o nabavi in izvajanju poskusov dolžne voditi uporabniške organizacije in jih hraniti najmanj 5 let, so naslednje:

- evidenca o nabavi in karanteni živali z enakimi podatki kot evidence, ki jih vodijo vzrejne organizacije;
- zapisniki o izvajanju poskusov s podatki o številki dovoljenja za poskus, namenu poskusa, datumu, številu in vrsti uporabljenih živali, načinu izvajanja poskusa, rezultatih in zaključku poskusa;
- poročilo po zaključenem poskusu s podatki o organizaciji, izvajalci poskusa, namenu poskusa, vrsti in številu uporabljenih živali, uporabi anestezije, opisu izida poskusa, času trajanja poskusa, žigu organizacije in podpisu vodje poskusa;
- skupno letno poročilo o izvedenih poskusih na obrazcu iz Priloge 5 Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih.

Evidence o usmrtnosti živali ter odstranjevanju trupel in drugih živalskih odpadkov, ki so jih dolžne voditi vse organizacije in jih hraniti najmanj 5 let, so naslednje:

- evidenca o usmrtnosti živali s podatki o živalski vrsti, spolu, starosti, oznaki, številu živali, datumu usmrtnosti, načinu usmrtnosti, razlogu usmrtnosti, načinu odstranitve in podpisu izvajalca usmrtnosti;
- evidenca o shranjevanju živalskih trupel s podatki o datumu shranitve, živalski vrsti, številu trupel in podpisu osebe, ki je shranila truplo živali;
- evidenca o oddaji živalskih trupel s podatki o datumu odpreme, opisu blaga, vključno s podatki o identifikaciji in kategoriji, količini, imenu in naslovu špediterja, imenu in naslovu prejemnika ter o njegovi številki odobritve, če je znana.

Letno poročanje o uporabljenih poskusnih živalih

O uporabljenih poskusnih živalih je treba poročati na VURS do konca meseca februarja za preteklo leto. Preglednice za poročanje vsebuje Priloga 5 Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. V organizacijah skupno letno poročilo pripravi strokovnjak za zaščito živali na podlagi zapisnikov o izvajanju poskusov ter poročil vodij poskusov. Štejejo se tiste živali, ki so bile v letu zbiranja vključene v poskus. Na podlagi letnih poročil o uporabljenih poskusnih živalih VURS sestavi končno letno poročilo. Končni podatki o številu in vrstah uporabljenih živali ter vrsti poskusov na njih so javni. Podatke za zadnjih pet let prikazujeta Preglednici 1 in 2. V Republiki Sloveniji se v tem obdobju niso uporabljali drugi laboratorijski glodavci, mačke, kopitarji, koze, primati razen človeka in prepelice.

Preglednica 1: Vrsta in število uporabljenih poskusnih živali v letih 2006–2010.

Vrsta živali	2006	2007	2008	2009	2010
Miši (<i>Mus musculus</i>)	7.590	7.721	10.313	6.926	8.199
Podgane (<i>Rattus norvegicus</i>)	4.767	4.208	1.675	648	500
Morski prašički (<i>Cavia porcellus</i>)	26	18	7	32	21
Kunci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	472	311	307	33	275
Psi (<i>Canis familiaris</i>)	6	0	0	0	0
Prašiči (<i>Sus</i>)	0	22	3	34	10
Ovce (<i>Ovis</i>)	50	11	4	4	4
Govedo (<i>Bos</i>)	0	19	0	0	0
Drugi sesalci (<i>Mammalia</i>)	4	14	0	0	0
Druge ptice (druge <i>Aves</i>)	265	10	129	42	0
Dvoživke (<i>Amphibia</i>)	1	0	0	0	0
Ribe (<i>Pisces</i>)	0	0	0	100	0
SKUPAJ	13.181	12.334	12.438	7.819	9.009

Preglednica 2: Število poskusnih živali glede na namen uporabe v letih 2006–2010.

Vrsta raziskave	2006	2007	2008	2009	2010
Temeljne biološke raziskave	1.457	1.726	1.319	1.282	1.141
Raziskave in razvoj izdelkov in sredstev za humano medicino, zobozdravstvo in veterinarsko medicino (izključene ocene toksičnosti in druge ocene varnosti)	2.929	2.548	3.182	1.959	1.941
Izdelava in nadzor kakovosti izdelkov in sredstev za humano medicino in zobozdravstvo	5.495	6.109	6.468	4.110	4.926
Izdelava in nadzor kakovosti izdelkov in sredstev za veterinarsko medicino	270	205	411	66	290
Ocene toksičnosti in druge ocene varnosti (vključno z ocenjevanjem varnosti izdelkov in sredstev za humano medicino, zobozdravstvo in veterinarsko medicino)	1.870	1.495	961	206	193
Diagnostika bolezni	683	82	2	17	410
Izobraževanje in usposabljanje	214	136	65	64	86
Drugo	263	33	30	115	22
SKUPAJ	13.181	12.334	12.438	7.819	9.009

Vsaka organizacija mora pripraviti tudi letno poročilo o usmrtnosti živali in ga poslati na VURS do konca meseca februarja za preteklo leto s podatki o vrsti, številu in izvoru živali ter razlogih usmrtnosti.

Izvajanje znanstvenoraziskovalnega ali izobraževalnega dela na živalskih tkivih

Izvajalec znanstvenoraziskovalnega ali izobraževalnega dela na izoliranih organih, tkivih in truplih predhodno usmrčenih živali je lahko visokošolski zavod po predpisih, ki urejajo visoko šolstvo, ali raziskovalna organizacija po predpisih, ki urejajo raziskovalno dejavnost. Izvajalci morajo biti odobreni od VURS. Postopek odobritve se začne na zahtevo izvajalca. Izpolnjevati mora predpisane pogoje za usmrtnost živali, odstranjevanje živalskih stranskih proizvodov in v primeru nastanitve živali tudi pogoje o prostorih, opreми, tehničnih pripomočkih in osebju.

Znanstvenoraziskovalno ali izobraževalno delo na izoliranih organih, tkivih in truplih predhodno usmrčenih živali ni opredeljeno kot poskus na živalih. Vendar mora izvajalec delo predhodno prijaviti na VURS s podatki o predvideni vrsti, številu živali, njihovem izvoru ter namenu uporabe. Usmrtnost živali sme izvesti ustrezno usposobljena oseba s predpisano metodo, pri čemer se za dopustno usmrtnost šteje postopek, ki živali povzroči hitro izgubo zavesti in smrt brez nepotrebnega trpljenja.

Izvajalci znanstvenoraziskovalnega ali izobraževalnega dela so dolžni voditi enake evidence o usmrtnosti živali, odstranjevanju živalskih trupel in tkiv kot organizacije ter jih hraniti 5 let.

Prav tako so dolžni voditi evidence o nabavi. Če imajo živali nastanjenе, pa so dolžni voditi tudi evidence o oskrbi živali in karanteni.

Tudi izvajalci morajo, v skladu s Pravilnikom o načinih usmrtnosti poskusnih živali, do konca meseca februarja pripraviti letno poročilo za preteklo leto in ga poslati na VURS s podatki o vrsti, številu in izvoru živali ter razlogih usmrtnosti.

Nadzorstvo

Nadzorstvo nad področjem poskusov na živalih in dela na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali opravljajo krajevno pristojni uradni veterinarji območnih uradov VURS v skladu z določbami Zakona o zaščiti živali, Zakona o veterinarskih merilih skladnosti in Zakona o inšpekcijskem nadzoru. Če nadzorni organ ugotovi, da se poskusi izvajajo v nasprotju z določbami predpisov in izdanim dovoljenjem, ustrezno ukrepa, prepove izvajanje poskusov in ustrezno sankcionira, v skladu s kazenskimi določbami Zakona o zaščiti živali. Splošna načela inšpekcijskega nadzora, organizacijo inšpekcij, položaj, pravice in dolžnosti inšpektorjev, pooblastila inšpektorjev, postopek inšpekcijskega nadzora, inšpekcijske ukrepe in druga vprašanja, povezana z inšpekcijskim nadzorom, ureja Zakon o inšpekcijskem nadzoru. Splošni pogoji za predpisovanje prekrškov in sankcij zanje ter pristojni organi in sodišča za odločanje o prekrških so določeni v Zakonu o prekrških.

BODOČA SLOVENSKA ZAKONODAJA O ZAŠČITI POSKUSNIH ŽIVALI

Z letom 2013 se bo v Republiki Sloveniji začela uporabljati nova zakonodaja o zaščiti poskusnih živali, ki bo imela implementirano Direktivo 2010/63/EU. Direktiva zahteva dosledno spoštovanje načela 3R ali zamenjave (replacement), zmanjšanja (reduction) in izboljšanja (refinement) pri vzreji, reji in uporabi živali. Definicija poskusa je natančnejša in v poskus vključuje ravnanja, ki pri živali povzročijo enakovredno ali hujšo stopnjo bolečine, trpljenja, stiske ali trajnih poškodb, kot jo predstavlja vbod igle v živalsko telo. Za organizacije bodo veljali obsežnejši kadrovske pogoji in morale bodo imeti enoto za dobro počutje živali. Postopki izdaje dovoljenj bodo razširjeni z ocenjevanjem projektov v uporabniški organizaciji in nato na državni etični komisiji. Vsi poskusi bodo morali biti razvrščeni v eno izmed štirih kategorij težavnosti: nepovraten, blag, zmeren, težaven. Pozitivno ocenjen projekt bo obravnaval pristojni upravni organ (VURS) in izdal dovoljenja za več poskusov znotraj projekta, s čimer se bo zmanjšalo administrativno breme. Za nekatere poskuse bo potrebno uvesti retrospektivno oceno. Javnost bo seznanjena z uporabo živali tudi z objavo netehničnih povzetkov projektov, ki jih bodo pripravile uporabniške organizacije. Vsaka država članica bo dolžna prispevati k razvoju in potrjevanju alternativnih pristopov, s katerimi bi zamenjali, zmanjšali in izboljšali uporabo živali v postopkih. V ta namen je imenovan referenčni laboratorij Unije, s katerim se bodo države članice povezovale preko kontaktne točke.

ZAKLJUČEK

Zakonodaja na področju poskusov na živalih se v Evropi in pri nas ureja v skladu s trendi omejevanja porabe živali v poskusih. Ustrezne institucije vlagajo precej napora v iskanje rešitev za njihovo zamenjavo z alternativnimi metodami, ki ne zahtevajo uporabe živali. Če je uporaba živali še potrebna, pa zakonodaja ščiti poskusne živali. Vendar sta poleg odgovornega ravnanja raziskovalcev in etične uporabe živali za zagotavljanje celovitega izpolnjevanja zahtev zakonodaje s področja zaščite živali nujna zadosten nadzor in ukrepanje v primerih kršitve.

LITERATURA

0. Close B, Banister K, Baumans V, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. Working party report. Lab Anim 1996; 30: 293–316.
1. Close B, Banister K, Baumans V, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2. Working party report. Lab Anim 1997; 31: 1–32.
2. Commission of the European Communities. Establishment of a European centre for the validation of alternative methods (ECVAM). Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. SEC (91) 1794 final. Brussels: CEC, 1991: 6 str.
3. Commission of the European Communities. Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on a Community action plan on the protection and welfare of animals 2006-2010. COM (2006) 13 final. Brussels: CEC, 2006: 9 str.
4. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C (2007) 2525 (2007/526/EC). Off J EC 2007; L 197 (50):1–89.
5. Council Decision of 23 March 1998 concerning the conclusion by the Community of the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1999/575/EC). Off J EC 1999; L 222 (42): 29–30.
6. Council Directive 86/609/EEG on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Off J EEC 1986; L 358 (29):1–28.
7. Council Directive 92/65/EEC of 13 July 1992 laying down animal health requirements governing trade in and imports into the Community of animals, semen, ova and embryos not subject to animal health requirements laid down in specific Community rules referred to in Annex A (I) to directive 90/425/EEC. Off J EEC 1992; L 268 (35): 1–33.

8. Council Regulation (EC) No 1/2005 of 22 December 2004 on the protection of animals during transport and related operations and amending Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation (EC) No 1255/97. Off J EEC 2005; L 3 (48): 1–44.
9. Directive 2003/65/EC of the European Parliament and of the Council of 22 July 2003 amending Council Directive 86/609/EEG on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Off J EEC 2003; L 230 (46):32–3.
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J EEC 2010; L 276 (53): 33–78.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe, 1986. No. 123.
12. Ornik D. Pregled zakonodaje z načelom 3R in pogoji za izvajanje poskusov na živalih. In: Perše M, ed. Poskusne živali: skrb za živali in kvalitetne raziskave. Ljubljana: UL, Medicinska fakulteta, 2010: 7–15.
13. Ornik D, Čadonič Špelič V. Records on the use of animals in experiments in the Republic of Slovenia and in other EU member states within a 15-year period. Slov Vet Res 2009; 46 (2): 47–60.
14. Pravilnik o etični komisiji za poskuse na živalih. Ur. list RS, št. 84/2000.
15. Pravilnik o načinih usmrtitve poskusnih živali. Ur. list RS, št. 140/2006.
16. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur. list RS, št. 88/2006, 81/2009.
17. Pravilnik o strokovnem svetu za zaščito živali. Ur. list RS, št. 62/2000, 57/2010.
18. Pravilnik o zbiranju, prevozu, skladiščenju, ravnanju, uporabi in odstranjevanju živalskih trupekot vrste živalskih stranskih proizvodov, ki niso namenjeni prehrani ljudi. Ur. list RS, št. 17/07.
19. Regulation (EC) No 1069/2009 of the European parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animals by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products regulation). Off J EU, L 300 (52): 1–33.
20. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Meuthuen, 1959: 239 str.
21. Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, in njenih izvedbenih predpisov Skupnosti in določitvi prekrškov za kršitve njenih določb. Ur. list RS, št. 100/2006.
22. Zakon o divjadi in lovstvu (ZDLov-1). Ur. list RS, št. 16/2004.
23. Zakon o inšpekcijskem nadzoru (ZIN-UPB1). Ur. list RS, št. 43/2007.
24. Zakon o kozmetičnih proizvodih (ZKozP-UPB1). Ur. list RS, št. 110/2003, 47/2004.
25. Zakon o ohranjanju narave (UPB). Ur. list RS, št. 96/2004.
26. Zakon o prekrških (ZP-1-UPB8). Ur. list RS, št. 29/2011.
27. Zakon o ratifikaciji Evropske konvencije za zaščito vretenčarjev, ki se uporabljajo v poskusne in druge znanstvene namene (MEKZVU). Ur. list RS-MP, št. 20/2006.
28. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO-UPB1). Ur. list RS, št. 23/2005, 21/2010.
29. Zakon o raziskovalni in razvojni dejavnosti (ZRRD-UPB1). Ur. list RS, št. 22/2006, 112/2007, 9/2011.
30. Zakon o splošnem upravnem postopku (ZUP-UPB2). Ur. list RS, št. 24/2006, 126/2007, 65/2008, 8/2010.
31. Zakon o upravnih taksah (ZUT-UPB3). Ur. list RS, št. 42/2007, 126/2007, 88/2010.
32. Zakon o veterinarskih merilih skladnosti (ZVMS). Ur. list RS, št. 93/2005.
33. Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. Ur. list RS, št. 46/2004, 109/2004, 84/2005, 115/2007, 96/2008, 36/2009.
34. Zakon o zaščiti živali (ZZZiv-UPB2). Ur. list RS, št. 43/2007.

UVOD

Nabava živali za uporabo v poskusih ali obnovitev reje mora potekati iz odobrenih vzrej z znanim zdravstvenim statusom znotraj naše države, iz držav članic ali uvoza iz tretjih držav. Vzrejne organizacije smejo živali prodajati, če izpolnjujejo predpisane pogoje. Živali, ki jih dajo v promet, morajo biti označene in pospremljene s predpisano dokumentacijo. Z ustreznim označevanjem živali zagotovimo sledljivost oziroma spremljamo živali od rojstva do zaključka uporabe. Slednje je z razvojem biomedicinske znanosti in natančnejšim spremljanjem poteka raziskav ter zapisovanjem pridobljenih rezultatov nujno potrebno.

NABAVA ŽIVALI

V Republiki Sloveniji nabavo živali opravljajo uporabniške ali vzrejne organizacije same, lahko pa delo prepustijo dobaviteljski organizaciji. Dobaviteljska organizacija je pravna ali fizična oseba, ki izključno dobavlja poskusne živali in ni vzrejna organizacija. Odobrena mora biti s strani Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS).

Pogoji za odobritev dobaviteljske organizacije

Dobaviteljska organizacija se odobri, če:

- a) zagotavlja ustrezen prevoz živali (v skladu s predpisi, ki urejajo pogoje in način prevoza živali);
- b) v primeru nastanitve živali zagotavlja prostore, opremo in tehnične pripomočke za nastanitev in oskrbo živali (v skladu s Prilogo I Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih in priporočilom Komisije 2007/526/EC);
- c) ima oskrbovalca(-e) živali;
- d) ima zagotovljeno zdravstveno varstvo živali;
- e) ima ustrezno opremo za usmrnitev živali, kadar je to potrebno;
- f) ima ustrezno zamrzovalno skrinjo pri začasnem skladiščenju živalskih trupel;
- g) zagotavlja predpisano odstranjevanje trupel poskusnih živali;
- h) vodi predpisane evidence.

Nabava laboratorijskih živali

Živalske vrste, ki jih vzrejne organizacije vzrejajo kot laboratorijske živali za uporabo v poskusih, so: miš (*Mus musculus*), podgana (*Rattus norvegicus*), morski prašiček (*Cavia porcellus*), zlati hrček (*Mesocricetus auratus*), kunec (*Oryctolagus cuniculus*), pes (*Canis familiaris*), mačka (*Felis catus*), prepelica (*Coturnix coturnix*) in primati razen človeka. V Republiki Sloveniji poteka le nabava laboratorijskih glodavcev in kuncev, ostalih živalskih vrst ne uporabljajo v poskusih kot laboratorijskih živali.

Pri nabavi živali izven slovenskih meja mora pošiljko živali spremljati veterinarsko spričevalo. Vzrejne organizacije, ki prodajajo živali, morajo biti odobrene in imeti uveden uradni veterinarski nadzor. V organizacijo smejo prihajati le živali iz odobrenih vzrej in iz nje odhajati pod uradnim nadzorom. Pregled zdravstvenega stanja živali, ki obsega pregled vseh živali in vseh živalskih vrst, opravijo najmanj 2-krat letno. Reprezentativne vzorce na predpisane bolezni odvzamejo pri vseh živalskih vrstah, analizo vzorcev pa opravi odobreni laboratorij. Izvidi na prisotnost povzročiteljev bolezni morajo biti negativni.

Preden uradni veterinar na mestu izvora potrdi veterinarsko spričevalo, pregleda živali in dokumentacijo. Na veterinarskem spričevalu potrdi, da živali v času pregleda niso kazale kliničnih

znakov nalezljivih bolezni. Prav tako potrdi, da so živali primerne za prevoz in da zanje ni nobene uradne omejitve. Živali ali pošiljka živali morajo biti označene na način, ki zagotavlja sledljivost. Veterinarsko spričevalo, ki spremlja pošiljko živali, vsebuje podatke o pošiljatelju, prejemniku, državi izvora in namembni državi, številko odobritve pošiljatelja in prejemnika, kraj natovarjanja, datum in čas pošiljanja, podatke o prevoznem sredstvu, prevozniku in njegovo številko odobritve, vrsto in število živali, namen in tranzitne države ter zdravstveno stanje živali. Barva žiga in podpis na veterinarskem spričevalu morata biti drugačne barve kot tisk na spričevalu. Država članica, ki nabavlja živali, lahko v skladu z zakonodajo Unije zahteva dodatna jamstva.

Uradni veterinar pristojnemu organu države članice in pristojnemu organu na namembnem kraju po računalniškem sistemu posreduje predpisane podatke pošiljke živali. Obveznosti prejemnika so, da dan pred prihodom o pošiljki obvesti območni urad VURS s podatki o vrsti pošiljke in predvidenem času prihoda. Uradni veterinar lahko na namembnem kraju izvede nadzor prispele pošiljke, tako da pregleda živali in spremljajoče dokumente.

Znotraj Republike Slovenije od laboratorijskih živali vzrejajo le laboratorijske glodavce. Vzrejna organizacija oziroma prodajalec ob oddaji živali izda spremni dokument, ki vsebuje podatke o pošiljatelju, izvor, vrsto in število živali, zdravstveno stanje živali in podatke o kupcu. Spremni dokument spremlja živali do namembnega mesta. Organizacija, ki proda živali, vodi evidenco o prodaji, organizacija, ki nabavi živali, pa vodi evidenco o nabavi.

Pri nabavi gensko spremenjenih organizmov (GSO) mora organizacija oziroma kupec pridobiti ustrezna dovoljenja Ministrstva za okolje in prostor (MOP).

V Republiki Sloveniji v zadnjih letih mesojedov v poskusih ne uporabljajo. Če bi bili v prometu kot laboratorijski psi, bi jih moralo spremljati veterinarsko spričevalo v obliki knjižice. Le-ta je obenem tudi identifikacijski dokument, izda pa ga veterinar veterinarske organizacije, ki ima koncesijo za izdajo spričeval ter skrbi tudi za vnos in prenos zahtevanih podatkov iz svojega registra v centralni register psov na VURS.

Nabava rejnih živali

Rejne živali v poskusih redko uporabljajo. V utemeljenih primerih, ko je njihova uporaba potrebna, morajo izvirati iz registrirane reje po predpisih, ki urejajo področje kmetijstva, živinoreje in veterinarstva.

Zapuščenih živali v poskusih ni dovoljeno uporabljati.

Odvzem prostoživeče živalske vrste iz naravnega okolja

Če je cilj poskusa mogoče doseči le z uporabo prostoživeče živalske vrste, mora uporabniška organizacija pred odvzemom živali iz naravnega okolja pridobiti dovoljenje od MOP, Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO). Omejitve veljajo zlasti za ogrožene prostoživeče živalske vrste, saj so poskusi na njih prepovedani, razen če je namen poskusa raziskava, katere cilj je ohranitev take ogrožene živalske vrste, in če gre za bistvene biomedicinske raziskave, ko se zadevna ogrožena živalska vrsta izkaže kot edina primerna. Trgovanje in uvoz prostoživečih živalskih vrst ureja uredba Sveta (ES) št. 338/97 ter določbe predpisov na področju varstva prostoživečih živalskih vrst v Republiki Sloveniji. Če prostoživeča živalska vrsta po Zakonu o divjadi in lovstvu spada med lovno divjad, mora organizacija od Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) v sodelovanju z MOP predhodno pridobiti posebno dovoljenje za uporabo divjadi v raziskovalne namene. Ulov prostoživečih živali smejo opravljati le izkušene osebe, ki poznajo navade in naravno okolje živali, v skladu s predpisi o lovu. Anestetik oziroma sredstvo za omamljanje izda veterinar ter določi njegov odmerik. Vbrizgavanje s strelnim orožjem lahko opravi le oseba, ki ima ustrezno orožno listino v skladu s predpisi, ki urejajo orožje. Če se žival ob ulovu poškoduje, ji je treba nemudoma nuditi veterinarsko pomoč. Kadar veterinar oceni, da bi ohranitev življenja poškodovani živali povzročala trpljenje in bolečine, jo je treba usmrtiti s predpisano metodo.

Ravnanje ob prihodu živali

Živali je treba ob prihodu nemudoma sprejeti in iz transportnih zabojnikov premestiti v čiste kletke ali druge nastanitvene prostore ter jih pregledati, nakrmiti in napojiti. Živali morajo določen čas ostati v karanteni. Priporočeno trajanje karantene za posamezne živalske vrste je predpisano, po potrebi pa jo lahko določi tudi veterinar. Karantena za laboratorijske glodavce iz odobrenih vzrejnih organizacij v Republiki Sloveniji je vsaj 5–15 dni. Karantena za živali iz drugih držav pa je 20–30 dni, za primате, razen človeka, celo 40–60 dni.

Ovisno od živalske vrste se lahko med karanteno pri živalih opravijo diagnostične preiskave, ki pa za laboratorijske glodavce niso predpisane, zato o njih odloči organizacija sama. Poškodovane živali je treba nastaniti ločeno in pod nadzorom, po potrebi morajo dobiti veterinarsko oskrbo. Živali, pri katerih obstaja sum na okužbo, in že obolele živali se morajo izolirati. Neozdravljivo bolne živali se nemudoma usmrtijo s predpisano metodo usmrčitve. Transportni zabojniki se morajo očistiti in razkužiti ali neškodljivo uničiti, če dekontaminacija ni izvedljiva.

Po premestitvi iz vzrejnih prostorov v prostore za uporabo v poskusih se morajo živali nekaj dni prilagajati na novo okolje, čas aklimatizacije določi strokovnjak za zaščito živali.

OZNAČEVANJE ŽIVALI

Označevanje živali z namenom kasnejšega prepoznavanja oziroma identifikacije je poznano že vrsto let. V zgodovini so uporabljali različne oblike preprostih načinov označevanja živali, ki so bile za živali večkrat boleče. Metode, ki pri živalih povzročajo bolečine, kot so žigosanje, luknjanje, zarezovanje, uporaba krilnih značk pri pticah in druge boleče metode, niso dovoljene. Metode označitve za zagotavljanje sledljivosti živali so predpisane in odvisne od živalske vrste. Biti morajo neboleče oz. čim manj boleče za žival, enostavne, razpoznavne, razpoložljive na trgu in cenovno ugodne. Ločimo trajne metode (mikročipiranje, ušesne znamke, tetoviranje), začasne (barvanje, britje, ovratnice), opisne (kartoteka, etikete) in druge.

Označevanje laboratorijskih živali

Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih od laboratorijskih živali le za pse, mačke in primате razen človeka določa, da morajo biti pred odstavitvijo od matere individualno označeni na čim bolj neboleč način. Če označitev pred odstavitvijo ni mogoča in se žival prestavi v drugo organizacijo, mora organizacija, ki je tako žival sprejela, do označitve živali vzdrževati popolno dokumentacijo, zlasti o njeni materi.

Za ostale laboratorijske živali individualna označitev ni predpisana. V takih primerih se označijo kletke ali ograde vsaj s podatki o vrsti, številu in starosti živali, času nastanitve in namenu nastanitve.

Za označitev laboratorijskih živali pogosto uporabljajo mikročipe. Mikročip sestavlja miniaturni transponder s predprogramirano trajno in neizbrisljivo številko, vgrajeno v hermetično zaprto kapsulo, ki se injicira v podkožje. Sistem sestavlja čitalec, ki z nizko-frekvenčnimi valovi aktivira transponder, da prenese številčno informacijo. Ta metoda označitve je predpisana za pse in mačke. Sistem mikročipov mora biti v skladu s standardi ISO. Mikročip vsebuje 15-mestno kodo, ki je sestavljena iz trimestne kode države, dvomestne kode proizvajalca in desetmestne individualne številke živali.

Ušesne značke uporabljajo za označitev različnih vrst živali. Biti morajo iz neškodljivih materialov, brez ostrih robov in površin ter z ostro in trdo konico. Na tržišču so dostopne v različnih velikostih, barvah in materialih. Velikost mora biti primerna živalski vrsti.

Tetoviranje je pogosta metoda označitve pri laboratorijskih glodavcih in kuncih. Zahteva uporabo posebnih klešč z menjajočimi se številkami ali črkami in tetovirno barvo. Tetovirna mesta so manj obarvani deli kože ali sluznice (rep, notranja stran ustnice, notranjost uhlja, področje dimelj).

V nekaterih vzrejah laboratorijske glodavce še vedno označujejo z luknjanjem uhljev s pomočjo posebnih ušesnih luknjačev ali klešč. Pred takim načinom označitve mora imeti označevalec natančno določen načrt označitve in dovolj oster luknjač ali klešče. Potrebno je poudariti, da je označitev laboratorijskih glodavcev z luknjanjem in zarezovanjem uhljev zaradi termoregulacije, ki pri glodavcih poteka v glavnem preko uhljev in repa, neprimerna metoda označitve in v nasprotju z določili Zakona

o zaščiti živali. Zakon namreč v 20. členu določa, da je krajšanje uhljev živalim, razen če je poseg v korist živalim, prepovedano.

Pri poskusnih živalih pogosto uporabljajočasne metode označitve, kot je barvanje dlake ali poroženelih delov. Za barvanje dlake uporabljajo različne barve, običajno rumeno, rdečo, vijolično, zeleno ali modro. Barvilo ne sme dražiti kože in povzročati drugih neželenih učinkov. Krajšanje ali britje dlake uporabljajo le za kratkotrajno označitev, običajno na hrbtu, vratu ali stegenskem področju.

Živalim lahko začasno namestijo tudi ovratnice primerne velikosti in iz različnih materialov s pritrjeno značko (plastično ali kovinsko).

Identifikacija rejnih živali

Identifikacija rejnih živali je predpisana. Imetniki rejnih živali morajo biti vpisani v evidenco imetnikov rejnih živali pri Službi za identifikacijo in registracijo živali (SIR). Evidenca vsebuje podatke o gospodarstvu, identifikacijsko številko KMG-MID gospodarstva ter stalež živali. Vsak imetnik rejne živali je dolžan med drugim redno voditi register živali na gospodarstvu, v katerega vpisuje vse spremembe v staležu živali, kot so rojstva, prihodi (nakup, sprejem v rejo), odhodi (prodaja, klanje, pogin in drugo) in začasni premiki (paša, sejem, razstava, drugo). Vpis mora opraviti najkasneje v sedmih dneh po dogodku.

Živali označuje imetnik sam ali pooblaščen veterinarska organizacija ali območni kmetijsko-gozdarski zavod. Pri rejnih živalih je predpisani način označitve z ušesnimi značkami iz plastike, ki imajo predpisano obliko in velikost, največkrat s kovinsko konico. Spoj obeh delov mora biti trden, tisk pa dobro čitljiv in obstojen.

Tele mora biti označeno najkasneje do 20. dneva starosti z enakima ušesnima značkama v vsako uho, ki sta rumene barve, trikotne oblike, velikosti 45 mm x 55 mm s predpisanim napisom.

Prašiči morajo biti najkasneje pred premikom označeni v desno uho z okroglo plastično značko rumene barve, premera najmanj 28 mm s predpisanim napisom s skupinsko identifikacijsko številko (SIŠ) za vse prašiče na gospodarstvu. Pri prašičih je mogoča označitev tudi s tetoviranjem v desno uho ali na desno stran hrbta tik za plečem.

Drobnica mora biti označena najkasneje pred premikom oz. do starosti 6 mesecev, v ekstenzivnih rejah do 9 mesecev, z enakima ušesnima značkama rumene barve, štirikotne oblike, velikosti 40 mm x 20 mm in predpisanim napisom v vsako uho.

Kopitarji morajo biti označeni z izdajo identifikacijskega dokumenta, ki vsebuje 15-mestno neponovljivo številko. Prva tri mesta zavzema numerična koda Republike Slovenije »705« (za angleške polnokrvne konje se uporablja koda SVN), druga tri mesta koda rejske organizacije, preostalih devet mest pa številka živali. Pri kopitarjih je možna dodatna označitev z žigom, tetoviranjem ali mikročipom.

Označevanje živali prostoživečih vrst v ujetništvu

Uporaba prostoživečih živalskih vrst v poskusih je prepovedana, dovoljena je le v izjemnih primerih in po pridobitvi vseh potrebnih predhodnih dovoljenj. Označevanje živali prostoživečih vrst v ujetništvu je določeno s posebnim pravilnikom. Za označitev je odgovoren imetnik živali, ki mora žival označiti najkasneje v desetih delovnih dneh od pridobitve oziroma v petih delovnih dneh po končani karanteni, če je ta daljša od 10 dni. Označevalec je fizična oseba, ki ima strokovni naziv doktor veterinarske medicine in veterinarsko licenco, je vpisana v evidenco in ni lastnik živali, ki jo označuje. Označevalec je dolžan označitev živali takoj vpisati v evidenco in obvestiti MOP. V evidenco vpiše podatke o lastniku živali, izvoru, datumu pridobitve, načinu pridobitve in opisu bivalnih razmer ter oskrbe živali.

Oznake morajo po obliki in kakovosti ustrezati predpisanim zahtevam. Kadar obstaja več možnih načinov označitve, mora označevalec najprej izbrati zaprti obroček, za tem mikročip in nazadnje odprti obroček. V ujetništvu izvaljene ptice označuje z zaprtimi obročki, katerih notranji premer je za posamezne živalske vrste predpisan. Noga, ki nosi obroček, mora biti nepoškodovana. Če notranji premer obročka ni določen, ptico označi z mikročipom ali odprtim obročkom, ki ustreza velikosti noge, ali opisno. Notranji premer odprtega obročka je prav tako predpisan za posamezno živalsko vrsto.

Sesalce, plazilce ter ptice, ki niso označeni z zaprtimi obročki, označi z mikročipi, razen živali, ki so lažje kot 200 gramov ali še niso zrasle do te teže, in želv, ki imajo spodnji ravni del oklepa (plastron) krajši od 100 milimetrov.

Če označitev ni možna, žival označi opisno z dokumentiranjem tistih zunanjih značilnosti, po katerih je žival mogoče enoznačno prepoznati. Pri tem navede velikost ali dolžino, težo, spol, starost in individualne posebnosti živali, ki so lahko prikazane na fotografiji. Če živali iz opisa ni mogoče enoznačno prepoznati, mora deponirati material za molekularno genske analize.

Če so sestavni deli označitve živali fotografije, morajo biti digitalne in posnete tako, da je identifikacijski vzorec na njih jasno viden. Na fotografijah morata biti posneta milimetrsko merilo in številka obročka ali mikročipa, če jo žival ima, ali zaporedna številka, pod katero je žival vpisana v evidenco.

Material za molekularne genske analize mora označevalec odvzeti, shraniti in zapečatiti po predpisanem protokolu ter ga poslati v zbirko. Označiti ga mora s čitljivo in trajno izpisanimi podatki (rodovno in vrstno ime živali, zaporedna številka, pod katero je žival vpisana v evidenco, vrsta in koda oznake, če jo žival ima).

Oznake dobavljajo tisti dobavitelji, ki so vpisani v evidenco, in le označevalcem ob ustreznem vodenju evidenc.

ZAKLJUČEK

Z nabavo živali iz preverjenih rej z znanim zdravstvenim statusom preprečimo vnos bolezni v rejo oziroma dobimo za poskus zdrave živali. Živali v reji ali v poskusu spremljajmo z uporabo predpisane metode označitve, če pa ta ni predpisana, izberimo takšno, ki bo za žival čim manj boleča.

LITERATURA

1. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C (2007) 2525 (2007/526/EC). Off J EC 2007; L 197: 1–89.
2. Council Directive 92/65/EEC of 13 July 1992 laying down animal health requirements governing trade in and imports into the Community of animals, semen, ova and embryos not subject to animal health requirements laid down in specific Community rules referred to in Annex A (I) to Directive 90/425/EEC. Off J EEC 1992; L 268: 1–33.
3. Council Regulation (EC) No 338/97 of 9 December 1996 on the protection of species of wild fauna and flora by regulating trade therein. Off J EEC 1996; L 61: 1–69.
4. Council Regulation (EC) No 1/2005 of 22 December 2004 on the protection of animals during transport and related operations and amending Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation (EC) No 1255/97. Off J EEC 2004; L 3: 1–44.
5. Milutinović Živin A. Biologija laboratorijskih glodavcev in kuncev. In: Perše M, eds. Poskusne živali: skrb za živali in kvalitetne raziskave. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2010: 29–38.
6. Pravilnik o identifikaciji in registraciji drobnice. Ur List RS 2010; 20(75): 10863.
7. Pravilnik o identifikaciji in registraciji goved. Ur List RS 2003; 13(16): 2283.
8. Pravilnik o identifikaciji in registraciji kopitarjev. Ur List RS 2006; 16 (90): 9698.
9. Pravilnik o identifikaciji in registraciji prašičev. Ur List RS 2011; 11(4): 348.
10. Pravilnik o označevanju živali prosto živečih vrst v ujetništvu. Ur List RS 2004; 14(58): 7469.
11. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16(88): 9477.
12. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2009; 19(81): 10977.
13. Pravilnik o veterinarskih pogojih za promet in trgovanje na teritoriju EU in uvoz iz tretjih držav živali, živalskega semena, jajčnih celic in zarodkov, za katere pogoji niso določeni v drugih veterinarskih predpisih, ter za promet in trgovanje z živalmi domačih vrst, ki se gojijo v živalskih vrtovih. Ur List RS 2006; 115(6): 12118.
14. Pravilnik o dopolnitvi Pravilnika o veterinarskih pogojih za promet in trgovanje na teritoriju EU in uvoz iz tretjih držav živali, živalskega semena, jajčnih celic in zarodkov, za katere pogoji

- niso določeni v drugih veterinarskih predpisih, ter za promet in trgovanje z živalmi domačih vrst, ki se gojijo v živalskih vrtovih 2008; 18(25): 2472.
15. Pravilnik o spremembah Pravilnika o veterinarskih pogojih za promet in trgovanje na teritoriju EU in uvoz iz tretjih držav živali, živalskega semena, jajčnih celic in zarodkov, za katere pogoji niso določeni v drugih veterinarskih predpisih, ter za promet in trgovanje z živalmi domačih vrst, ki se gojijo v živalskih vrtovih. 2010; 20(42): 5980.
 16. Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. Ur List RS 2004; 14(46): 5963 ; Ur List RS 2004; 14(109): 12972 ; Ur List RS 2005; 15(84): 8752 ; Ur List RS 2007; 17(115): 16486 ; Ur List RS 2008; 18(96): 12961 ; Ur List RS 2009; 19(36): 5046.
 17. Zakon o divjadi in lovstvu (ZDLov-1). Ur List RS 2004; 14(16): 1577 ;
 18. Odločba o ugotovitvi, da so 26. člen, šesti odstavek 29. člena in osmi odstavek 29. člena Zakona o divjadi in lovstvu v neskladju z Ustavo, o delni razveljavitvi prvega odstavka 65. člena in o razveljavitvi prve alineje sedmega odstavka 65. člena Zakona o divjadi in lovstvu in o ugotovitvi, da tretji odstavek 1. člena, 3. člen, peti in šesti odstavek 4. člena, tretji odstavek 6. člena, tretji odstavek 7. člena, drugi odstavek 8. člena, 9., 11., 25., 31., 32., 33., 34., 35. 36., 40. člen, prvi in sedmi odstavek 50. člena, prvi in drugi odstavek 53. člena, 67., 75. in 76. člen Zakona o divjadi in lovstvu niso v neskladju z Ustavo, ter o zavrženju pobud. Ur List 2006; 16(120): 12764.
 19. Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o divjadi in lovstvu (ZDLov-1A) Ur List RS 2008; 18(17): 1255.
 20. Zakon o kmetijstvu (Zkme-1). Ur List RS 2008; 18(45): 4965.
 21. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO-UPB1). Ur List RS 2005; 15(23): 1968 ;
 22. Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO-B). Ur List RS 2010; 20(21): 2658.
 23. Zakon o ohranjanju narave (ZON-UPB2). Ur List RS 2004; 14(96): 11541 .
 24. Zakon o veterinarskih merilih skladnosti (ZVMS). Ur List RS 2005; 15(93): 9632.
 25. Zakon o zaščiti živali (ZZZiv-UPB2). Ur List RS 2007; 17(43): 5943.
 26. Zakon o živinoreji (ZZiv). Ur List RS 2001; 12(18): 1325.
 27. Zakon o urejanju prostora (ZUreP-1). Ur List RS 2002; 12(110): 13057.
 28. Zakon o graditvi objektov (ZGO-1). Ur List RS 2002; 12(110): 13084.
 29. Zakon o spremembah, dopolnitvah in razveljavitvi določenih zakonov na področju kmetijstva in gozdarstva (ZdZPKG). Ur List RS 2004; 14(45): 5736.

UVOD

Etika in **moral**a sta besedi, ki ju vsakodnevno pogosto uporabljamo v skoraj enakem pomenu. Beseda **etika** izhaja iz grške besede *etos*, **moral**a pa iz latinske besede *mores*; obe besedi imata enak pomen in pomenita navade, običaje. Filozofsko gledano pa se pomena besed razlikujeta. Medtem ko **etika** teoretično presoja o moralnih načelih in jo nekateri avtorji imenujejo tudi moralna filozofija, **moral**a predstavlja bolj praktična prepričanja o tem, kaj je pravilno ravnanje za dobro življenje (Dolan, 1999; Pogačnik, 2009).

Prvi znani zapisi o poskusih na živalih so iz starega Rima, sistematično raziskovanje delovanja človeškega telesa pa se je začelo šele v renesansi (Dolan, 1999). Kasneje se je uporaba poskusnih živali zelo razširila, nedolgo tega pa so številne poskuse opustili ali prepovedali zaradi etičnih, praktičnih in finančnih razlogov (van der Gulden in sod., 2005) ali pa so jih omejili na poskuse na delih živali, npr. na celičnih kulturah in tkivnih vzorcih (Naquet, 1998). S pojavom novih bolezni (AIDS, TSE) in strahom pred njihovo širitvijo pa so zopet začeli opravljati poskuse tudi na visoko razvitih živalih (Naquet, 1998). Danes poskusne živali uporabljajo predvsem za pridobivanje bioloških produktov (hormoni, protitelesa) ter za ugotavljanje bioloških odzivov (aplikacija različnih substanc) in bioloških procesov (van der Gulden in sod., 2005).

Ni dvoma, da je uporaba živih živali v raziskovalnem delu prinesla pomembna spoznanja, potrebna za napredek v biomedicinskih znanostih, vendar delo z živimi živalmi poleg znanstvenega pristopa zahteva tudi etični vidik smiselnosti njihove uporabe (Naquet, 1998; Dolan, 1999; Van der Gulden in sod., 2005; Pogačnik, 2009).

Etične teorije o uporabi živali v poskusu

Odnos javnosti do rabe živali v poskusih pri raziskovalnem delu je zelo različen. Mnenja posameznikov pa je mogoče razvrstiti v poznane teorije o odnosu do poskusov na živalih. Etične teorije o uporabi živali v poskusu so: absolutizem, relativizem, konsekvencializem, utilitarizem, skepticizem, emotivizem, naturalizem, pragmatizem in speciesizem (Dolan, 1999).

Absolutizem je ena izmed najbolj »udobnih« etičnih teorij, saj jasne smernice in dogme dajejo določeno stopnjo zanesljivosti. Ker so si zanesljivost in nezanesljivost ter gotovost in dvom popolnoma nasprotujoči, ni prostora za srednjo pot. Absolutni moralist zanika, da bi okoliščine lahko vplivale na določene dogodke, in trdi, da je treba upoštevati tudi posledice (Dolan, 1999).

Relativizem priznava obstoj nezdružljivih moralnih skrajnosti, ki obstajajo med različnimi kulturami, in smatra, da so moralni koncepti čustveni in jih zato ne moremo imeti za resnico. Začetnik relativizma je bil grški filozof Protagoras (490–420 pr. n. št.), ki je svojo idejo utemeljeval s tem, da ni odgovora na vprašanje, ali je veter topel ali hladen. Po njegovem razmišljanju je veter lahko topel za enega in hladen za nekoga drugega. Njegove ideje so prikazale, kako se moralne norme ene kulture razlikujejo od druge. Odnos do dobrobiti živali v različnih državah je značilen primer razlik v njihovi morali (Dolan, 1999).

Konsekvencializem verjame, da je posledica nekega dejanja neposreden dejavnik za merilo moralne vrednosti dejanja. Pri tem ne upošteva sredstev, ki so pripeljala do določenega cilja. Tako je lahko uporaba sredstva, ki je samo po sebi slabo, upravičena, če je rezultat dober.

Utilitarizem je najbolj pomembna moderna etična teorija, katere začetki izhajajo iz viktorijanske Anglije, in pravi, da je pri odločitvi o moralni upravičenosti nekega dejanja pomembno pretehtati vsoto

vseh koristi, ki jih dejanje prinaša, in jo primerjati z vsoto vseh škodljivih posledic. Po teoriji utilitarizma je potrebno zadostiti naslednjim pogojem (Dolan, 1999):

- principu koristi: pri uporabi živali v znanstvenih raziskavah mora biti splošna korist maksimalna. Živalim, ki jih za raziskave uporabimo, morajo biti zagotovljeni najbolj humani pogoji bivanja;
- standardu vrednosti: vprašanje je, katere vrednosti se uporabljajo za osnovni standard. Pri tem pogoju dejansko primerjamo dobro stran uporabe živali s škodo, ki jo povzročimo živalim;
- konsekvencnosti: pozitiven rezultat za človeško zdravje je lahko protiutež negativnim posledicam za poskusne živali;
- pravičnosti: vsa živa bitja, vključena v poskus, morajo biti pravično obravnavana.

Skepticizem vključuje vse teorije, ki domnevajo, da ni možno doseči skupne moralne teorije, ki bi bila sprejemljiva za vse (Dolan, 1999).

Emotivizem je etična teorija, pri kateri je ocena, ali je neko dejanje dobro ali slabo, odvisna od čustvene reakcije osebe, ki podaja oceno. Ta ocena naj ne bi bila le individualna, temveč naj bi pomenila oceno javnosti. Pričakuje se, da so ocenjevalci objektivni (Dolan, 1999).

Naturalizem predstavlja etični sklop, ki se nanaša na različne oblike konsekvencializma. Kriterij za upravičenost oziroma pravilnost nekega dejanja sloni na empirični značilnosti narave. Naturalisti zagovarjajo trditev, da je možno vsako moralno vrednost dokazati z empiričnim dokazom, in ne priznavajo nadnaravnega značaja, kot to predvideva moralna teologija (Dolan, 1999).

Pragmatizem je oblika empiricizma. Pomen in upravičenost pragmatičnega razmišljanja sta v praktičnem pomenu. Nekaj je dobro, če ima določen namen in vodi v dobro dejanje oz. dober zaključek (Dolan, 1999).

Speciesizem je izraz, ki ga filozofi uporabljajo za opis diskriminatornega obnašanja človeka do živali. To razlikovanje sloni na večvrednostnem predsodku, ki je edini kriterij za razlikovanje med človekom in ostalimi vrstami (Dolan, 1999).

ETIKA IN ŽIVALI

Vplivi človeka na živali in morebitne koristi

Udomačitev in selekcija

Začetki udomačitev živali segajo v prazgodovino, kar je razvidno iz jamskih poslikav in slik na papirusih. Risbe večjih živali so se pojavile tudi na hieroglifih. Ni dvoma, da so udomačene živali ljudem zelo koristile, vendar je bila udomačitev koristna tudi za živali, saj so bile bolje zaščitene pred plenilci, dobile so varno zavetje pred neugodnimi vremenskimi razmerami ter vodo in hrano, kar je zvišalo stopnjo njihovega preživetja.

S selekcijo so bile vzrejene živali, ki so glede na svoje divje prednike in sorodnike večje, hitreje, inteligentnejše, imajo višjo proizvodnost in so bolj prilagojene določenemu namenu. Pozitivni rezultati selekcije vsekakor pripomorejo k izboljšanju kakovosti življenja živali, povečanju njihove vrednosti in proizvodnosti, vendar je umetna selekcija v nasprotju z naravno, kar pri neprimernem izvajanju omogoča nastanek pogojno patogenih bolezni in še posebej v intenzivnih vzrejah zmanjšuje odpornost živali.

Genetsko spremenjeni organizmi (GSO) predstavljajo temo, ki je po pomembnosti v vrhu razprav v znanosti in medijih. Genetske modifikacije pri živalih izvajajo z namenom, da bi proizvajali npr.: zdravilne proteine, ki bi se izločali z mlekom različnih vrst živali. Tak je faktor IX za zdravljenje B hemofilije. Prav genetsko spremenjene živali porajajo določene etične zadržke, npr. parjenje transgenega bika s spremenjenim genom za laktoferin – bikove potomke bi tako lahko izločale mleko s človeškim laktoferinom, ki je pomemben za zdravljenje črevesnih infekcij, kar je še posebej ključno pri bolnikih z aidsom, po drugi strani pa laktoferin ščiti krave pred mastitisom. Etično vprašljive so v nekaterih

sredinah tudi klonirane živali – klonirana ovca Dolly, ki je bila po vseh fizioloških parametrih popolnoma normalna, je po naravnem parjenju imela potomce (Dolan, 1999).

Veterinarska medicina

Razvoj veterinarske medicine zagotovo predstavlja največjo korist, ki jo imajo živali od človeka. Veterinarska medicina ni namenjena samo domačim živalim, temveč tudi prostoživečim vrstam. Številna zdravila in cepiva, ki so na voljo hišnim ljubljencem, vzrejnim in prostoživečim živalim, omogočajo kakovostnejše življenje, višjo stopnjo preživetja in višjo starost (Dolan, 1999).

Ohranjanje živalskih vrst

Ni dolgo tega, kar so zahteve po zaščiti prostoživečih vrst živali postale intenzivnejše. Zakonodaja je npr. upoštevala nekatere zahteve lovcev in ribičev, a je hkrati tudi ščitila populacijo divjih živali. Danes je v veljavi konvencija za zaščito nekaterih vrst ogroženih živali in rastlin (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES), ki je postala del zakonodaje številnih držav (Dolan, 1999). Cilj tega mednarodnega sporazuma je doseči, da trgovina z živalskimi in rastlinskimi vrstami ne ogroža njihovega preživetja (CITES, 2012).

Odvisnost živali v naravi

Zaradi človekovega poseganja v naravo postajajo vse oblike življenja vedno bolj soodvisne. Preživetje nekaterih živalskih vrst in njihovo dobrobit sta tako postala odvisna izključno od človekovih dejanj. Sodobna »teorija kaosa« predlaga, da je treba vsako človekovo dejanje – poseg v biotop, najsi bo še tako neznameno, skrbno preučiti zaradi morebitnih posledic za okolje, od katerega so odvisne tudi vse živalske vrste, še posebej najobčutljivejša kategorija – ogrožene vrste živali (Dolan, 1999).

Odvisnost živali v raziskavah

Laboratorijske živali so odvisne le od svojih skrbnikov oz. oseb, ki z njimi delajo. Zakonodaja s tega področja zahteva predvsem določene pogoje nastanitve: dovolj bivalnega prostora, pitno vodo in ustrezno prehrano, primerno osvetlitev, ventilacijo, zdravstveno varstvo itd., s katerimi naj bi poskušali zadostiti osnovnim pravicam in potrebam teh živali (Dolan, 1999).

Pravice živali

Tudi živalim v poskusu pripadajo pravice. Razlikujemo naravne pravice (zadovoljevanje interesov in potreb živali), moralne (obveznosti ljudi) in zakonsko določene pravice. Na področju zaščite živali je nekaj mednarodnih konvencij, ki ščitijo pravice živali. To so:

- Deklaracija o pravicah živali (UNESCO, Bruselj, 1978);
- Deklaracija o uporabi živali v biomedicinskih raziskavah (WHO, Hong Kong, 1989) in
- Evropska konvencija za zaščito vretenčarjev, ki se uporabljajo v raziskovalne in druge znanstvene namene (Council of Europe, Strasbourg, 1986);
- Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene.

Te konvencije vsebujejo predvsem določila za ravnanje z živalmi v poskusu ter določajo različne normative za rabo, bivanje, transport ipd. (Dolan, 1999).

Osnove ocenjevanja etične sprejemljivosti poskusov na živalih

Ko pričenjamo s pripravo raziskave, v kateri bomo uporabili poskusne živali, moramo z etičnega in moralnega stališča od vsakega osveščenega raziskovalca pričakovati, da bo sam sebi odgovoril na naslednja vprašanja:

- Katero žival bom uporabil v poskusu in kakšne so njene lastnosti?
- Ali sem pri načrtovanju poskusa upošteval vse zakonske predpise, ki urejajo področje poskusov na živalih ter področje zaščite in dobrega počutja živali?
- Kaj je sprejemljiva uporaba živali v poskusu?
- Ali za dosego cilja raziskave obstajajo druge alternativne raziskovalne metode?
- Katere živalske vrste so še sprejemljive za kakovostno izvedbo poskusa?
- Na osnovi katerih razlogov sem se odločil, da bom v predlaganem poskusu uporabil izbrano vrsto, spol, starost in število živali?
- Kaj vse lahko vpliva na dobro počutje živali, ki smo jih izbrali za poskus?
- Ali poznam značilnosti in posebnosti izbrane živalske vrste?
- Ali sem glede na trajanje, manipulacijo in način usmrčitve živali izbral optimalni način izvedbe poskusa?
- Ali sem s stališča dejavnikov tveganja za zdravje ljudi dobro seznanjen z morebitnimi nevarnostmi za zdravje oseb, ki sodelujejo pri izvedbi poskusa?
- Ali sem zagotovil ustrezne preventivne in kurativne programe za zaščito zdravja in dobrega počutja živali v poskusu?

Metode za ocenjevanje upravičenosti poskusov na živalih

Da bi lažje ugotavljali upravičenost poskusov na živalih, so bili predlagani različni sistemi točkovanja etičnosti teh poskusov (Dolan, 1999).

Po sistemu, ki ga je predlagal **David G. Porter**, je vsaka uporaba živali, ki ima razvit sistem za zaznavo bolečine, odklon od idealnega. Idealni sistem bi moral težiti k opustitvi uporabe živali v poskusu, kjerkoli je to mogoče.

Porter je v okviru speciesizma predlagal sistem točkovanja za živali v poskusih, od relativno neobčutljivih bitij pa do visoko občutljivih in inteligentnih sesalcev (mehkužci naj bi bili ocenjeni z eno točko, šimpanzi z milijonom točk) (Dolan, 1999), ter pri tem postavil osem kategorij.

Predlagani sistem točkovanja (od 1 do 5), s katerim bi zmanjšali trpljenje živali v poskusih (prva postavka je ocenjena z eno, zadnja s petimi točkami):

1. Namen poskusa:

- Lajšanje hudih bolečin pri človeku ali drugih vretenčarjih.
- Lajšanje zmerne bolečine ali trpljenja človeka ali drugih vretenčarjev.
- Jasna korist za zdravje ali dobrobit človeka ali drugih vretenčarjev.
- Delna korist za zdravje ali dobrobit človeka ali drugih vretenčarjev.
- Temeljne raziskave za napredek znanja (ni razvidno, ali je koristno za lajšanje bolečine ali za zdravje človeka ali živali).

2. Realen potencial poskusa za doseganje cilja:

- Odličen.
- Zelo dober.
- Povprečen/zmeren.
- Omejen.
- Zelo omejen ali ga je nemogoče oceniti.

3. Vrsta živali:

- Mehkužci – nizka sposobnost zaznave/zavesti.
- Ribe in amfibije – nekaj zaznave.
- Plazilci – sposobnost zaznave je ohranjena, zavest pa je omejena.
- Sesalci (brez primatov, mesojedov, kitov), ptiči – zaznava in zavest.
- Primati, mesojedi, kiti – zaznava, visoka inteligenca in predhodno znanje.

4. Stopnja bolečine:

- Nična.
- Minimalna.
- Zmerna.
- Znatna.
- Močna.

5. Trajanje neugodnih dražljajev ali stiske:

- Ga ni ali je zelo kratko.
- Kratko.
- Zmerno.
- Dolgo.
- Zelo dolgo.

6. Trajanje poskusa:

- Zelo kratko = 10^{-5} življenjske dobe.
- Kratko = 2×10^{-4} življenjske dobe.
- Zmerno = 2×10^{-2} življenjske dobe.
- Dolgo = 2×10^{-1} življenjske dobe.
- Zelo dolgo = več kot 2×10^{-1} življenjske dobe.

7. Število živali:

- 1–5.
- 5–10.
- 10–20.
- 20–100.
- Več kot 100.

8. Kakovost oskrbe živali med poskusom (upoštevajoč naravno življenjsko okolje živali v poskusu):

- Odlična.
- Zelo dobra.
- Srednja.
- Dobra.
- Slaba.

Pri ocenjevanju moramo upoštevati vseh osem ocenjevalnih kategorij. Najvišji možni skupni seštevek je lahko 40, najnižji pa 8, kar pomeni, da je vsak poskus na živali, tudi najbolj idealen, še vedno odklon od idealnega sistema, v katerem naj bi dosegli nič točk (Dolan, 1999).

Nizozemski sistem

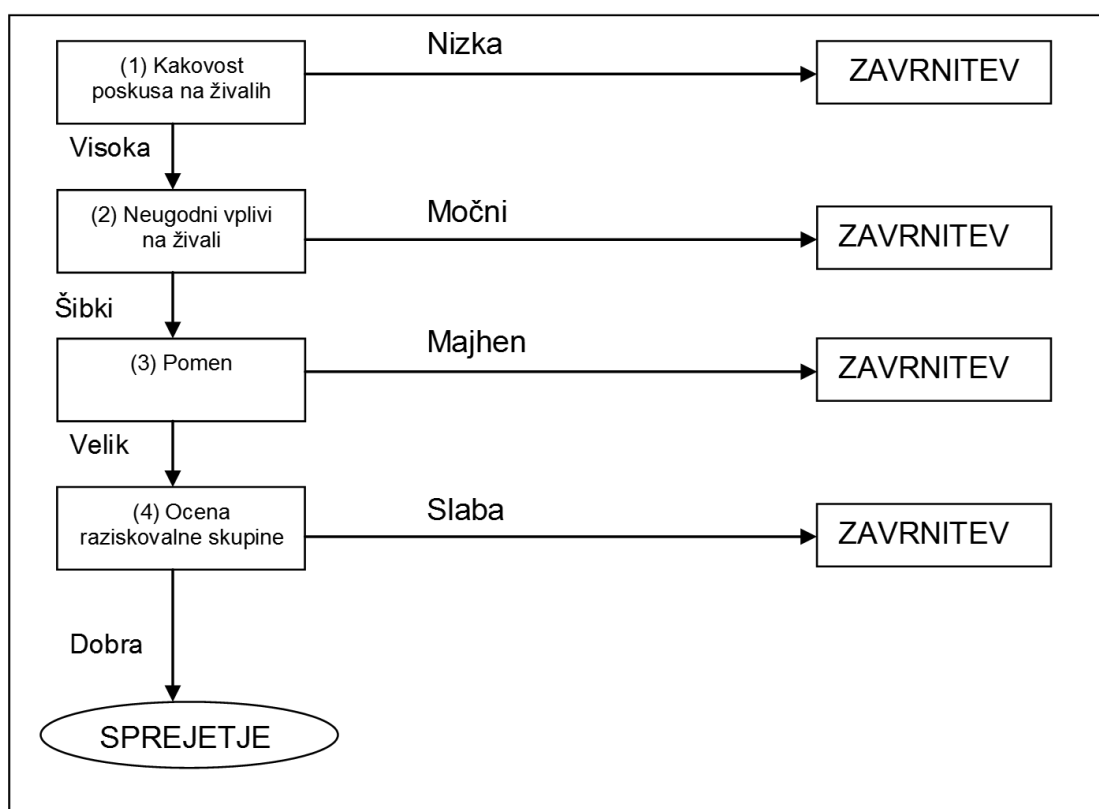
V nizozemskem sistemu se ocena bolečine in stiske živali v poskusu po predlogu posebne delovne skupine nacionalnega odbora za poskuse na živalih pri ministrstvu za javno zdravje ocenjuje na treh stopnjah: nizki, zmerni in visoki, v kombinaciji s trajanjem poskusa (manj kot 1 dan, 1–7 dni, 8–30 dni in več kot 30 dni). Ravni ocene bolečine in stiske temeljijo na fizioloških znakih ter na obnašanju živali in ne na seznamu znanstvenih postopkov.

Pri oceni poskusa upoštevamo tudi usposobljenost raziskovalcev (bolje usposobljeni lahko neki poskus, ki je označen kot težek za živali, izvedejo ob le zmerni bolečini ali stiski živali). Ko je stopnja neugodnih učinkov za živali določena, določimo pomen projekta (Dolan, 1999).

Tabela 1: Vpliv pomena raziskave in neugodnih učinkov na živali v poskusu za potrditev ali zavrnitev poskusa (Dolan, 1999).

Pomen raziskave	Neugodni učinki na živali		
	Majhni	Srednji	Močni
Majhen	Zavrnitev	Zavrnitev	Zavrnitev
Srednji	Potrditev	Potrditev	Zavrnitev
Velik	Potrditev	Potrditev	Potrditev

Grafika 1: Drevo odločanja: vpliv kakovosti in pomena raziskave, vplivov na živali v poskusu in kakovosti raziskovalne skupine na sprejetje ali zavrnitev poskusa (Dolan, 1999).



Švicarski model

Namen tega modela je olajšati oceno etičnih vprašanj, ki se nanašajo na uporabo transgenih rejnih živali, npr. njihova uporaba v kmetijstvu (spodbujanje proizvodnje), pridobivanje organov za uporabo v humani medicini in pridobivanje proteinov za uporabo v humani medicini.

Ocenjevanje se začne z vprašanjema:

1. Ali predlog za raziskavo vsebuje pomembno vprašanje, ki ga ni možno rešiti z nobeno izmed nadomestnih metod?
2. Ali je kakovost raziskave dovolj dobra za doseg načrtovanega cilja?

Tabela 2: Specifikacija treh etičnih principov: spoštovanje dobrobiti, avtonomnosti in pravice živali v poskusu (Dolan, 1999).

	DOBROBIT	AVTONOMNOST	PRAVICA
ŽIVALI V POSKUSU	Dobrobit živali	Naravno obnašanje	Zagotavljanje izpolnitve naravnih fizioloških potreb živali
POTROŠNIKI	Varna hrana	Izobraževanje potrošnika in možnost izbire (označevanje)	Svetovna razpoložljivost hrane
BOLNIKI	Kakovost življenja	Informacije o možnostih izbire zdravljenja	Svetovna razpoložljivost zdravljenja
DRUŽBA	Življenjski standard	Mnenje javnosti	Pravična razdelitev
BIOTOP	Ohranjanje	Vzdrževanje biološke raznolikosti	Sobivanje populacij v danem okolju

Sledi neposredna ocena slabosti in koristi raziskave. Pri končni oceni se upoštevata dobrobit in zagotavljanje avtonomnosti ter pravic živali v poskusu, potrošnika, bolnikov, družbe in biotopa. Poskus je lahko (Dolan, 1999):

- sprejet – toda s kontrolo pojava stranskih vplivov;
- strokovno sprejet – predlog je sprejet s pogojem, da se izpolnijo priporočila;
- začasno zavržen – vlogo je možno ponovno vložiti, če se izpolnijo specifične izboljšave, in
- dokončno zavržen.

VELJAVNA ZAKONODAJA V SLOVENIJI IN EU

Zakonodaja štiti poskusne živali in predpisuje pogoje za izvajanje poskusov (ETS 123/86; 86/609/EEC; D 2010/63). Njen glavni cilj je zmanjšanje števila živali v poskusu. Uporaba živali je kljub alternativam v nekaterih primerih še potrebna in predpisana (preskušanje zdravil, biocidov, drugih kemikalij, aditivov za živila, krme).

1. Zakon o zaščiti živali (Ur. l. RS 43/07)

Zakon velja za vse živali z razvitimi čutili za sprejem zunanjih dražljajev in razvitim živčnim sistemom, da boleče čutijo zunanje vplive (vretenčarji, pri drugih živalih pa glede na stopnjo njihove občutljivosti). Uveljavlja načelo dobrobiti živali in opredeljuje odgovornost ljudi za zaščito živali, zaščito njihovega življenja, zdravja in dobrobiti. Zakon sestavljajo štiri poglavja: poskusi na živalih, delo na izoliranih tkivih, organih in truplih predhodno usmrčenih živali, nadzorstvo in kazenske določbe.

2. Pravilnik o etični komisiji za poskuse na živalih (Ur. l. RS, št. 84/2000)

Etična komisija, ki jo sestavlja devet strokovnjakov veterinarske, medicinske, biološke, farmacevtske in zootehnične stroke, je strokovni svetovalni organ pri MKGP. Deluje po poslovniku ter proučuje in obravnava vloge za podajo mnenj pri izdaji dovoljenja za določen poskus na živali, proučuje vprašanja ter podaja strokovna mnenja o upravičenosti uporabe živali v določenem poskusu ali poskusih nasploh, podaja mnenja o uporabi strokovno uveljavljenih in ovrednotenih ter mednarodno priznanih alternativnih metod, ki ne zahtevajo uporabe živali v poskusih, daje mnenja in predloge pri pripravi predpisov o zaščiti živali v poskusih, vodi evidence o že opravljenih poskusih na živalih in opravlja druge svetovalne naloge s področja zaščite živali v poskusih.

3. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS, št. 88/06)

Ta pravilnik določa pogoje za izvajanje poskusov na živalih, organizacije na področju vzreje, dobave poskusnih živali in izvajanja poskusov, vrste poskusnih živali, pogoje za pridobitev dovoljenja za izvajanje poskusov ter obveznosti organizacij iz tega pravilnika. Pravilnik sestavlja šest poglavij: splošne določbe, pogoji za organizacije, pogoji za izvajanje poskusov, pogoji oskrbe in nastanitve živali, evidence, prehodne in končne določbe in pet prilog: nastanitev in oskrba živali, zdravstveno stanje živali, program usposabljanja, obrazec vloge in letno poročanje. Poskus je vsak poseg na živi živali v poskusne ali druge znanstvene namene, ki ji lahko povzroči trpljenje, stisko, trajne poškodbe ali smrt in vključuje tudi druge ukrepe, ki povzročijo ali lahko povzročijo rojstvo živali v navedenih okoliščinah. Najmanj boleče metode usmrčitve ali označevanje živali ne štejejo za poskus. Poskus se začne, ko je žival prvič pripravljena za uporabo v poskusu, in se konča, ko nadaljnje opazovanje ni več potrebno. Uporaba živali šteje za poskus tudi v primerih, ko se z anestetiki, analgetiki ali z drugimi metodami preprečujejo njeno trpljenje, stiska ali trajne poškodbe.

4. Pravilnik o načinih usmrčitve poskusnih živali (Ur. l. RS, št. 140/06)

Pravilnik predpisuje načine usmrčitve in določa pogoje za osebe. Pri izbiri načina usmrčitve živali je treba zagotoviti, da postopek živali povzroči najmanjše možne bolečine, vznemirjanje ali trpljenje. Odstranjevanje živalskih trupel poteka v skladu z Uredbo (EC) 1069/2009 in Pravilnikom o ugotavljanju skladnosti vozil (Ur. l. RS, št. 17/07).

ZAKLJUČEK

Poskusi na živalih imajo še vedno ključno vlogo v napredku biomedicinskih znanosti. Zakoni in etična načela preprečujejo nekoristno uporabo živali in jim nudijo zaščito pred nepotrebnim trpljenjem.

LITERATURA

1. Dolan K. Ethics, animals and science. Bodmin, Cornwall: Blackwell Science, 1999.
2. Pogačnik M. Etika uporabe poskusnih živali. In: Štrbenc M, Frangež R, Malovrh T, Zebič A, eds. Poskusi na živalih: zakonodajni vidiki poskusov na živalih: napotki za načrtovanje dela s poskusnimi živalmi: delovno gradivo za slušatelje tečajev za delo s poskusnimi živalmi. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2009: 44–9.
3. van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. 2nd rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 2001.
4. Naquet R. Animal experimentation: ethical problems. In: The ethics of animal experimentation: proceedings of the EBRA/FELASA European congress. Brussels, 1996. London: EBRA, 1998: 35–43.
5. CITES <http://www.cites.org/> (15. 10. 2012)
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123/86).
7. Council Directive for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC).
8. Directive 2010/63 of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off J EU 2010; L 276: 33–79.
9. Zakon o zaščiti živali. Ur List RS 2007; 17(43).
10. Pravilnik o etični komisiji za poskuse na živalih. Ur List RS 2000; 10(84).
11. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16(88).
12. Pravilnik o načinih usmrtnitve poskusnih živali. Ur List RS 2006; 16(140).
13. Uredba (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 21. oktobra 2009 o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi. Off J EU 2009; L 300: 1–33.

Na pobudo Charlesa Huma, ki je bil ustanovitelj UFAW (Universities Federation for Animal Welfare), sta William M. S. Russel in Rex L. Burch leta 1959 objavila knjigo z naslovom *The principles of humane experimental technique*. V knjigi sta predstavila pravilo 3R (replacement – nadomeščanje, reduction – zmanjšanje in refinement – prečiščenje). Izmed teh je najtežje popolno nadomeščanje uporabe živih živali. Njuno delo se nanaša zgolj na vretenčarje, čeprav navajata, da se v poskusne namene uporabi tudi veliko insektov, predvsem za razvoj sredstev za njihovo uničevanje. Etične komisije uporabljajo pravilo 3R kot osnovo za ocenjevanje predlogov za poskuse na živalih.

REPLACEMENT oz. NADOMEŠČANJE je po njuni definiciji katerakoli znanstvena metoda, ki vključuje uporabo neobčutljivih materialov, sposobnih nadomestiti metode, ki uporabljajo zavestne vretenčarje. Razlikujemo absolutne in relativne metode nadomeščanja. Pri relativni obliki še vedno potrebujemo žive živali, pri absolutni pa ne. Tako se absolutne metode z vidika zaščite živali smatrajo kot »absolutni ideal«, sprejemljive pa so tudi metode nadomeščanja v kombinaciji z zmanjševanjem števila živali, npr. tkivne kulture v virologiji.

Najpogostejša metoda relativnih oblik nadomeščanja je delo na izoliranih celicah, tkivih ali organih vretenčarjev. Tkiva lahko vzdržujemo v *in vitro* pogojih le za kratek čas za akutne eksperimente in najbolj tipični primeri so kontraktilni organi sesalcev in dvoživk (srce, črevo, maternica itd.) ter izolirani živci in živčno-mišični preparati. Te metode so relativno stare, saj se danes uporabljajo komercialno pripravljene celične linije in tkivne kulture.

Absolutne metode lahko obsegajo uporabo endoparazitov (raziskave fiziologije in biokemije parazitov in razvoj ter preučevanje delovanja kemoterapevtikov), rastlin (npr. preučevanje delovanja digitalisa) in mikroorganizmov (npr. preučevanje prehrane) ter neživih fizikalnih in kemičnih sistemov.

REDUCTION oz. ZMANJŠEVANJE ŠTEVILA ŽIVIH ŽIVALI. Zavedati se moramo, da uporaba večjega števila živali pomeni tudi večje »stroške« z vidika trpljenja živali. Zmanjšanje števila je mogoče doseči na več načinov. Prvi način je zagotovo dober načrt poskusa. Običajno se pri samem načrtovanju poskusa in določanju števila živali upoštevajo le podatki iz literature in izkušnje (določeni standardi glede na vrsto poskusa), zanemarjen pa je statistični izračun pri pripravi protokola poskusa in obdelavi dobljenih podatkov. S kombinacijo vseh treh lahko ugotovimo, da bi bilo v nekaterih primerih potrebno število živali lahko manjše, v drugih primerih pa celo večje. Pomembno je, da določen vzorec prinese tudi rezultate, ki so uporabni, saj bo v nasprotnem primeru potrebno poskus ponoviti in bo končno število živali mnogo večje. Natančnost nekega eksperimenta je odvisna od velikosti vzorca in napake variance.

Za doseg optimalnega zmanjšanja števila živali bi morale biti vse živali v poskusu popolnoma identične. Tako bi lahko npr. za izdelavo krivulj odziva na določen odmerek učinkovine potrebovali eno samo žival. Vendar se živali med seboj razlikujejo ne samo med vrstami, temveč tudi znotraj vrste. In ravno ta raznolikost je težava vseh poskusov, ki se izvajajo na živalih.

Za zmanjševanje števila živali je potreben dober načrt poskusa, v katerem se predvidijo možne spremenljivke, kako se jim izogniti ter tako zagotoviti možnost ponovitve enakega modela. Med različnimi spremenljivkami je najbolj nepredvidljiva fiziološka varianca. Nadzorujemo jo lahko z nadzorom genotipa in neposrednega okolja, ki vpliva na razvoj fenotipa. Teoretično bi se lahko razlikam v genotipu izognili z uporabo genetsko uniformnih živali, kot so npr. »inbred« linije ali F1 hibridi, vendar je bilo ugotovljeno, da je lahko skoraj 20 odstotkov skupne variance posledica dejavnikov okolja v času pred in po rojstvu. S sistematičnim genetskim nadzorom lahko dosežemo, da delamo z živalmi, ki imajo določen genotip, vendar je za nekatere poskuse potreben tudi različen odziv živali, tako da uporaba genetsko uniformnih živali ni vedno priporočljiva.

REFINEMENT oz. PREČIŠČENJE je vsak postopek ali metoda, ki zmanjša stopnjo bolečine nehumanih postopkov na živalih, uporabljenih v poskusih, in izboljša njihovo dobro počutje. Pomeni tudi izboljšanje pogojev bivanja v smislu zmanjšanja »stiske« živali. »Stiska« je razumljena kot stanje, v katerem se žival ni sposobna odzivati na stresne dejavnike in zato kaže spremembe v obnašanju. To pomeni, da je potrebno živalim v največji možni meri zagotoviti okolje, ki najbolj ustreza njihovim biološkim zahtevam. V času poskusa pa to pomeni, da so izbrane metode z minimalno stopnjo bolečine, npr. uporaba primerne anestezije pri posegih, ki povzročajo bolečino. V nekaterih državah pri ocenjevanju poskusov uporabljajo lestvice za označevanje kategorij poskusov glede na stopnjo bolečine. K zagotavljanju dobrega počutja živali pripomore tudi zagotavljanje zdravstvenega varstva, oskrba živali ter morebitne obogatitve okolja. Zavedati se je treba, da izboljšanje pogojev ni pomembno samo z vidika dobrega počutja in zaščite živali, temveč tudi z vidika boljših rezultatov poskusa.

ZAKLJUČEK

Osnovno vodilo pri načrtovanju poskusov na živalih je dosledno upoštevanje pravila 3R. Prvi pogoj pri presoji ustreznosti načrtovanega poskusa je izbor ciljnega materiala. Na razpolago so številne metode, ki nadomeščajo uporabo živih živali. Zato mora biti uporaba vretenčarjev dobro utemeljena. V kolikor je za doseganje cilja poskusa nujno potrebna uporaba vretenčarjev, je potrebno določiti najmanjše število živali, ki so potrebne za doseganje cilja raziskav. Pri tem ima pomembno vlogo načrt poskusa, ki mora biti podprt s statističnimi izračuni. Uporabiti je treba vse možnosti, ki bodo zagotovile, da so živali v poskusu najmanj izpostavljene nepotrebnim škodljivim vplivom in je za njihovo dobro počutje poskrbljeno v največji možni meri.

LITERATURA

1. Balls M, Golberg AM, Fentem JH, et al. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM workshop report 11. *Altern Lab Anim* 1996; 23: 838–66.
2. Russell WMS, Burch RL, Hume CW. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead: Universities Federation for Animal Welfare UFAW, 1992.
3. van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science: revised edition: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. 2nd rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 2001.

Valentina Kubale, Azra Pogačnik, Malan Štrbenc

UVOD

Glodavci, predvsem podgane in miši, so najpogostejše uporabljane živali v biomedicinskih poskusih. Njihova gojitev je enostavna, genetska sorodnost s človekom pa relativno visoka, zato so fiziološko in mikroanatomsko glodavci ljudem precej podobni. Glodavcev je zelo veliko vrst, trenutno je opisanih 2016, kar predstavlja kar 43 % vseh vrst sesalcev. Imajo izjemno reprodukcijsko sposobnost, zato se je evolucija pri njih odvijala hitreje kot pri drugih sesalcih. So tudi izjemno prilagodljivi in s tem kozmopoliti (v naravi jih ni le na Antarktiki, Novi Zelandiji in nekaterih pacifiških otokih), najdemo pa jih praktično v vseh biomih. K temu prispeva tudi njihova majhnost, velika večina glodavcev ima telesno maso pod 100 g. Zaradi številčnosti, raznovrstnosti, prilagodljivosti in evolucijske konvergence so sistematski odnosi med številnimi družinami in poddružinami kompleksni in pogosto tudi nerazrešeni. Kljub temu so v številnih splošnih morfoloških značilnostih glodavci precej uniformni.

Pogosta živalska vrsta v poskusih so tudi kunci. Kunci spadajo med lagomorfe oz. red zajcev in žvižgačev. Načini prehranjevanja in morfološke prilagoditve so pri tej skupini živali zelo podobni glodavskim. Najnovejše genetske raziskave pravzaprav kažejo, da so lagomorfi sorodni npr. mišim in podganam ravno toliko kot skupina južnoameriških glodavcev *Hysticomorpha*. Med te sodijo budre, činčile, deguji itd. in tradicionalna sistematika jih uvršča med glodavce. V prihodnosti lahko pričakujemo, da bodo sistematiki ali lagomorfe uvrstili med glodavce ali pa glodavce razbili na več skupin.

Opisali bomo splošno anatomijo glodavcev in lagomorfov s poudarkom na tistih morfoloških posebnostih, ki jih ločijo od drugih domačih živali.

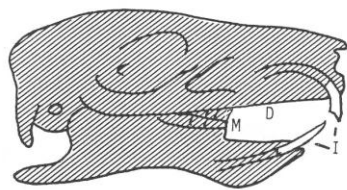
SKUPNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GLODAVCEV

Najočitnejša lastnost glodavcev, ki je skupini dala tudi ime, je specializirano zobovje. Tipično imajo 16 zob, nekatere skupine do 22 in ena izjema 28. Pri sesalcih zobovje delimo na sekalce (incizive), grabilce ali podočnike (kanine), predmeljake ali sprednje kočnike (premolarje) in meljake ali zadnje kočnike (molarje).

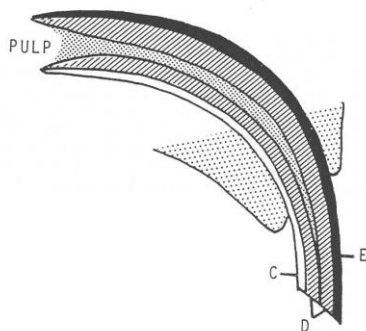
Prvi in edini par incizivov v zgornji in spodnji čeljusti pri glodavcih najpogostejše imenujemo kar glodači. To so specializirani zobje, ki rastejo celo življenje. Na njih ne ločimo običajnega sistema krone in korenine. Imajo širok in stalno odprt koreninski vrat, sklenina (emajl) pokriva zobovino (dentin) na zunanji, ustnični strani, na notranji pa je cement po celotni dolžini zoba. Ker je emajl najtrši in cement najmehkejši, se med razvojem zob krivi navznoter, grizna ploskev pa brusi poševno, kar ustvari oster zunanji rob.

Podočnikov (kaninov) glodavci nimajo, večina tudi ne premolarjev in med incizivi ter molarji je široka vrzel – diastema. V diastemo se zavijajo ustnice in med glodanjem zaprejo vhod v ustno votlino, tako vanjo ne zaidejo neužitni produkti glodanja.

Molarji so dobro razviti in imajo prečne skleninske grebene, ki se uporabljajo kot ključ za določanje vrst. Pri nekaterih glodavcih, npr. činčilah in budrah, pa tudi pri kuncih, so tudi molarji stalno rastoči. Razporeditev tkiv znotraj zoba je pri činčilah enaka kot na incizivih, molarji se rahlo krivijo in rahlo poševno obrabljajo.



I – incizivi, M – molarji, D – diastema



E – sklenina, emajl, D – zobovina, dentin, C – cement, PULP – zobna pulpa

Slika 1: Položaj in sestava zob pri podgani.

Ko glodavci glodajo, se ujemajo samo grizne ploskve incizivov. Če uporabljajo molarje, premaknejo spodnjo čeljust nazaj. Tak je položaj čeljusti tudi med počitkom, spodnji incizivi so skriti za zgornjim parom. Moč ugriza sekalcev in sposobnost žvečenja se nekoliko razlikuje glede na potek notranje in zunanje žvekalke, tretja, senčna žvekalca pa je pri glodavcih slabo razvita. Na podlagi nasadišč in izhodišč notranje in zunanje žvekalke sistematično razvrstijo glodavce na *Myomorphia* (miši in sorodniki, sem sodijo tudi polhi in hrčki), *Sciuromorpha* (veverice in sorodniki, sem sodijo tudi bobri) ter *Caviomorpha* (ježevci in sorodniki, sem sodijo tudi budre in drugi južnoameriški glodavci).

Telo je pri glodavcih večinoma čokato s kratkimi okončinami. Prsni koš je primerjavi s trebušno votlino majhen. Večina ima rep, a je zelo različnih oblik; hrčki ter ježevci in sorodniki pa ga praktično nimajo. Večinoma so plantigrade živali (stopalo in dlan sta med hojo v celoti v stiku s tlemi). Nekateri južnoameriški glodavci so zasedli nišo odprtih savan, se prilagodili na tek in so digitigradi (tal se dotikajo samo prsti dlani ali stopala). Semiakvatične živali, npr. bobri, imajo plavalno kožico. Večinoma so glodavci zelo okretni in okončine uporabljajo tudi za oprijemanje in plezanje. Nekateri glodavci imajo izrazito podaljšane zadnje okončine prilagojene za skakanje in tako miši mošnjičarke in skakači dosegajo hitrosti do 48 km/h.

Večinoma so glodavci rastlinojedi, tudi vsejedi (odvisno tudi od razpoložljivosti hrane), temu značilno imajo obsežno debelo in slepo črevo za razgradnjo celuloze. Izjema je polh, ki nima slepega črevesa. Želodec je večinoma dvodelen, sprednji del (*proventriculus*) predstavlja začasno skladišče zaužite hrane.

Ledvice so fižolaste oblike, histološko pa so očitne dolge henlejeve pentlje, kar ima za fiziološko posledico hiperosmolaren urin. Vsi glodavci imajo koščeno osnovo v penisu - *baculum* (os penis) in dobro razvite moške pomožne spolne žleze. Posebnost je izrazit proksimalni režanj prostate, ki ga imenujemo koagulacijska žleza. Položaj moda je spremenljiv, pri večini vrst je na glavatem koncu moda obsežno t. i. maščobno telo, ki ohranja ingvinalni kanal odprt, da se moda pomikajo iz mošnje ali skrotuma proti trebušni votlini. Samci činčil skrotuma nimajo.

Pri samicah sta običajno genitalna in urinarna pot popolnoma ločeni, vendar je genitalna pogosto neopazna (zaprta z membrano). Maternica je dvodelna, *uterus duplex*, placenta pa diskoidalna. Histološko placento označimo za hemohorialni tip, ki ga razen pri glodavcih najdemo samo še pri lagomorfih in primatih. Na diskastem področju se maternalno tkivo deloma razgradi in horionski epitelij (trofoblast) neposredno obliva materina kri.



Slika 2: Ločen urogenitalni sistem pri glodavcih (levo) in situacija pri samicah večine sesalcev (desno).

PODGANA (*RATTUS RATTUS*)

Podgana je bila prva žival, ki so jo udomačili prav za znanstvene namene, in sicer že v prvi polovici 19. stoletja. Bela ali laboratorijska podgana je albino varianta sive podgane (*Rattus norvegicus*, angleško brown rat ali Norwegian rat). Danes obstajajo številne pasme oz. sevi, redko pa se je v poskusih uporabila tudi črna podgana (*Rattus rattus*, angleško black, roof ali ship rat). Obe vrsti podgan izvirata iz Azije, in sicer je črna prispela v Sredozemlje že v antičnih časih, siva pa šele na koncu srednjega veka, vendar je bila uspešnejša in v Evropi črno skoraj izpodrinila.

Zunanost

Podgana ima čokato telo z zelo dolgim repom (85 % dolžine telesa). Dlake na repu so redke, koža pa močno poroženeva, da ustvari prekrivajoče se luske, ki so dodatno prekrite z rumenkastim maščobnim izločkom (*sebum*). Ušesa so majhna in pokrita z nežno dlako. Ušesa in rep predstavljata pomembno mesto za oddajanje toplote, saj imajo podgane zelo malo žlez znojnic. Smrček je gol, zgornja ustnica pa preklana (*phyltrum*). Na ustnicah so dolge čutilne dlake (*vibrissae*). Sekalci oz. glodači so normalno rumenkasto obarvani zaradi železovih pigmentov. Albino podgane imajo rdeče oči in so občutljive na močno svetlobo.

Samci so večji od samic, tipična telesna masa samcev je 450 – 520 g in samic 250 – 300 g. Dobro rejeni stari samci pa lahko tehtajo celo 1000 g. Odrasli samci imajo relativno velika moda in velik podolgovat skrotum jim daje zaokrožen videz. Ob nizkih temperaturah ali stresu se moda premaknejo v ingvinalni kanal in skrotum ni več izrazit. Samci nimajo seskov. Pri mladih živalih ločimo spola s primerjanjem anogenitalne razdalje. Razdalja med zadnjično odprtino (anusom) in genitalno papilo (bradavico, kjer je zunanja odprtina sečnice) je pri samčkih dvakrat večja v primerjavi s samičkami. Samičke imajo ločeni urinarno in genitalno pot: sečnica (*urethra*) se odpira ob bazi klitorisa, odprtina nožnice (*vulva*) pa je malo kavdalno.

Zadnje okončine so daljše od sprednjih in podgane pri hitrem teku poskakujejo. Na vseh okončinah imajo po 5 prstov. Dlani in stopala so gola in imajo izrazite poroženele blazine. Na konicah prstov so zakrivljeni kremplji, le na palcu sprednje okončine je kremplj sploščen in spominja na noht. Palec je sicer kratek, a dobro gibljiv in omogoča prijemanje.

Koža in podkožje

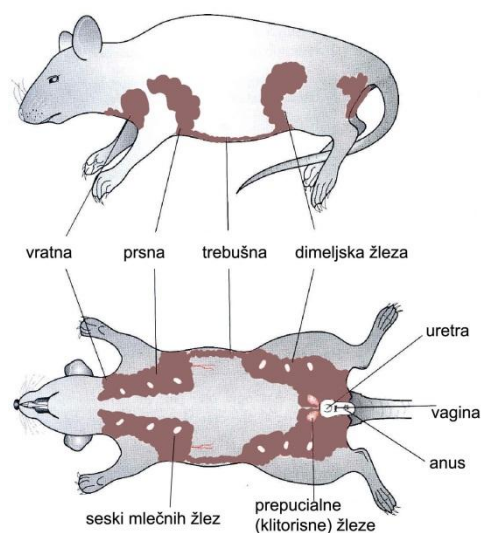
Kožuh je sestavljen iz krovne dlake in podlanke. Na zgornji ustnici in smrčku je 50–60 čutilnih dlak (*vibrissae*) v 8 – 10 vrstah. Manjše vibrise so še na spodnji ustnici, bradi in zgornji vek. Vrhnjica (*epidermis*) je tanka in večinoma odlakana. Koža hrbta ima višjo vsebnost vode in manjšo lipidov v primerjavi z abdominalnim predelom. V usnjici (*dermis*) in podkožju (*subcutis*) so številni tkivni makrofagi razen na področju repa.

Žleze lojnice so ob dlačnih mešičkih. Okoli ustne reže, anusa, prepucija in seskov najdemo modificirane lojnice. Na bazi ušesa se nahaja velika modificirana lojnica – Zymbalova žleza. Starejši samci imajo lahko vzdolž hrbta povečano izločanje rumeno rjavega lojnega sekreta. Žleze znojnice so skoncentrirane le na bazi podplatnih blazin. Podgane nimajo specializiranih vonjavnih žlez.

Telesni poveji (fascije) so rahli, zato koža navidezno ni priraščena na podlago. Manj je gibčna koža pri zelo zamaščenih živalih, saj se maščobno tkivo nabira v podkožju. Sive podgane se dobro prilagodijo

na nizke temperature v okolici in v treh do štirih tednih ustvarijo zalogo rjave tolšče. Ta je za razliko od bele tolšče na videz rožnata in se nahaja v obliki majhnega trakca na vrhu hrbta med plečnicama in ventralno na vratu. Če se razvije, obdaja celotno področje vratu, sega v aksilarno področje in vhod v prsno votlino ter se nahaja tudi v ingvinalnem (dimeljskem) področju.

Samice imajo obsežne mlečne komplekse. Skupaj je šest parov mlečnih žlez: tri na prsnem košu (toraksu), eden na trebuhu (abdomnu) in dva v dimeljski (ingvinalni) regiji. Mlečne žleze se raztezajo tudi na stransko (lateralno) področje telesa.



Slika 3: Kompleksi mlečnih žlez in osramje pri samici podgane.

Skeletni sistem

Skeletni sistem ne kaže kakšnih posebnih adaptacij na tek, kopanje ali plezanje. Osifikacija se zaključi relativno pozno, pri 1 letu starosti. Lobanja je podolgovata, čeljustni sklep zelo gibljiv, zrast spodnjih čeljustnic pa hrustančna. Hrbtenico sestavlja 7 vratnih, 13 prsnih, 6 ledvenih, 4 križna in do 31 repnih vretenc. Prvih sedem reber je sternalnih (se pripenjajo direktno na prsnico), zadnja tri pa so prosta (njihovi hrustančni deli se ne spojijo v rebrni lok). Spodnji del reber v starosti popolnoma okosteni.

Glodavci imajo dobro razvito ključnico (*clavicula*), ki sega od plečnice (*scapula*) do sprednjega dela prsnice (*sternum*). Golenica in mečnica (*tibia* in *fibula*) sta distalno zraščeni. Stopalnice in prstnice na zadnji okončini so daljše od dlančnic in prstnic sprednje okončine.

Volumen prsnega koša (*thorax*) je v primerjavi z obsegom trebušne votline (*abdomen*) relativno majhen, deluje stisnjeno.

Krvožilni sistem

Srce je konično. Na levi strani je le delno prekrito s pljučnim tkivom in lažje dostopno. Osrčnik (perikard) je tanek in prosojen. Kranioventralno je pritrjen na priželjc (timus), ki pri odraslih glodavcih ne zakrni tako kot pri številnih domačih živalih. V desni preddvor se izlivata dve sprednji veliki dovodnici (*vv. cavae craniales*). Močne vene, ki omogočajo odvzem krvi, se nahajajo na vsaki strani repa (lateralni repni veni). V nekaterih primerih se uporablja tudi orbitalni venozni pletež (*plexus ophthalmicus*), ki leži na medialni ploskvi očnice).

Dihalni sistem

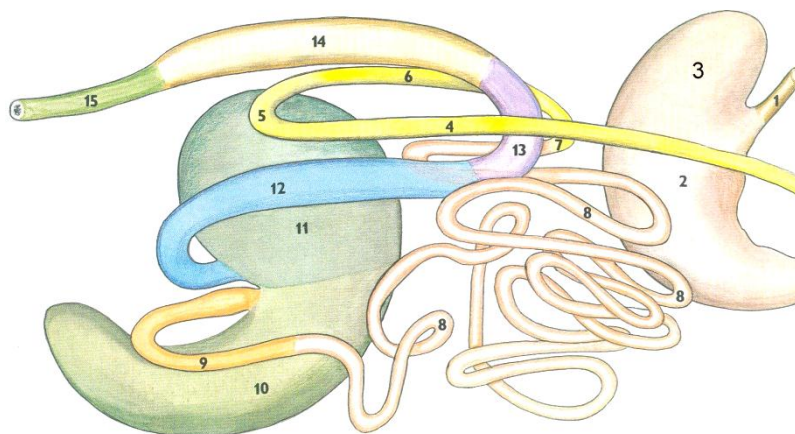
Podgane so tako kot vsi glodavci obligatorni dihalci skozi nos. Leva polovica pljuč je enotna, nerazdeljena, desna pa razdeljena na štiri režnje (*lobus cranialis, medius, caudalis et accessorius pulmonis dextris*).

Prebavila

Zobovje je opisano pri splošnih značilnostih glodavcev. Podgane imajo 16 zob – par incizivov in tri pare molarjev v obeh čeljustih. Incizivi izrastejo 10. dan po rojstvu, molarji 19. dan, približno 125. dan po rojstvu molarji nehajo rasti. V orofarniksu nimajo tonzil.

Kranialni del želodca se imenuje *proventriculus*, ima bolj blede sluznico, ki je brezžlezna. Tanko črevo je dolgo, približno 5 – 6 kratne dolžine telesa, in obkroža oporek debelega črevesja (*mesocolon*). Slepno črevo (*caecum*) je razmeroma dolgo in zapognjeno v obliki črke U. Nahaja se v levi polovici trebušne votline (abdomna), vendar nima stalnega položaja. Debelo črevo v ožjem pomenu (*colon*) na desni najprej oblikuje nekaj zank, nato ima kratek potek in ga delimo kot pri ostalih sesalcih na navzgornji, prečni in navzdolnji kolon.

Trebušna slinavka (*pancreas*) je velika prebavna žleza in ima več izvodil v dvanajstnik – nekatera se združijo z žolčevodom. Jetra so izrazito razčlenjena (*lobus dexter lateralis et medialis, lobus sinister lateralis et medialis, lobus caudatus* je razdeljen na *processus caudatus* in *processus papillaris*, zadnji pa še na *pars praeventricularis* in *pars retroventricularis*). Velika posebnost podgan je, da nimajo žolčnega mehurja – žolčnika.



Slika 4: Shema prebavil pri podgani.

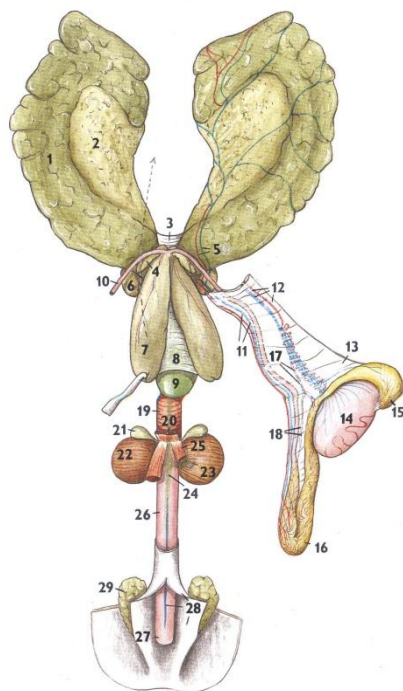
1 požiralnik, 2 želodec, 3 brezžlezni želodec – *proventriculus*, 4 *pars descendens duodeni*, 5 *flexura duodeni caudalis*, 6 *pars ascendens duodeni*, 7 *flexura duodenojejunalis*, 8 *jejunum*, 9 *ileum*, 10 *caecum*, 11 *ampulla coli*, 12 *colon ascendens*, 13 *colon transversum*, 14 *colon descendens*, 15 *rectum*

Urinarni sistem

Ledvice so fižolaste oblike, desna leži v področju od prvega do tretjega ledvenega vretenca, leva rahlo kavalno od nje. Ledvica je enobračavičasta. Histološko lahko določimo številne nefrone z daljšimi zankami, kar omogoča boljšo koncentracijo urina. Prazen sečni mehur je hruškaste oblike.

Reprodukcijski sistem

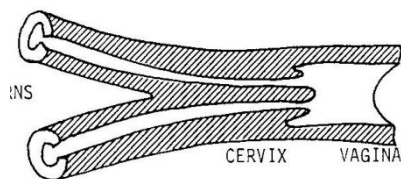
Moda se pri samčkih spustijo med 30. in 40. dnem po rojstvu, ingvinalni kanal pa ostane odprt. Modo je ovalno in meri 8 – 12 mm, na področju glave in repa nadmodka je normalno precej maščobe (*corpus adiposum testis*). V penisu je koščena osnova – *os penis*. Samci imajo zelo dobro razvite pomožne spolne žleze, katerih najbolj očiten izloček je kopulatorni čepek, ki zamaši nožnico samičk na koncu parjenja. Žleze so: zelo velika reznjičasta *glandula vesicularis* (mehurnica), ob njenem medialnem robu poteka *glandula coagulationis* (koagulacijska žleza, imenovana tudi dorzalni režanj prostate), prostata (obsečnica) z ventralnim in lateralnim režnjem, ampularne žleze (žleze semenovoda) in bulbouretralna žleza (čebulnica). Ob penisu ležijo relativno velike prepucialne žleze, katerih lojni izloček vsebuje tudi feromone, s starostjo pa regresirajo oz. se napolnijo s starim sebumom. Ekvivalent teh žlez najdemo tudi pri samičkah.



Slika 5: Moški spolni organi.

1 *glandula vesicularis*, 2 *glandula coagulationis*, 4 *glandula ductis deferentis*, 6 *prostata dorsalis*, 7 *prostata ventralis*, 9 *vesica urinaria*, 14 *testis*, 15-16 *epididimis*, 21 *glandula bulbourethralis*, 27 *glans penis*, 29 *glandula preputialis*

Jajčniki ležijo kavdalno od ledvic, s tem da je levi bližje središčni ravnini. *Bursa ovarica* je popolnoma zaprta in normalno precej zamaščena, tako da sta jajčnika precej skrita. Jajcevod je zavrt in obkrožuje jajčnika z 10–12 vijugami. Maternica je dvojna (*uterus duplex*). Maternična roga se na koncu združita in imata 7–10 mm skupno zunanjo vzdolžno muskulaturo miometrija, vendar se še vedno vsak ločeno odpira na materničnem vratu. Mesoovarij in mesometrij vsebujeta precej maščobe. Uretra se odpira popolnoma ločeno od vaginalne odprtine, ki je do pubertete zaprta z membrano.



Slika 6: Shematski prikaz materničnega vratu podgane.

Endokrine žleze

Hipofiza je rdečkastorjava žleza v turškem sedlu na bazi lobanje. Ščitnica leži ventrolateralno na prvih 4–5 sapnikovih obročkih, je iz dveh rožnatih režnjev, povezanih z nežnim isthmusom. Obščitnici sta kroglasti, blede in običajno ležita na kranialnem delu ščitnic. Rjavi fižolasti nadledvični žlezi ležita blizu kranialnega pola vsake ledvice in sta pritrjeni na notranjo ledveno muskulaturo. Desno pokriva repati reženj jeter in je nekoliko bolj odmaknjena od središčne ravnine. Samice imajo nekoliko večje nadledvične žleze od samcev, podobno tudi divje podgane večje od udomačenih.

Čutni organi

Vid je pri podganah sekundarnega pomena, saj so nočne živali. Oči so relativno majhne in postavljeno lateralno, zorni kot je 360°, vendar imajo slepo točko tik pred smrčkom. Leča ima omejeno sposobnost akomodacije, očesne mišice pa so dobro razvite, čeprav oči ne premikajo. Za očesnim zrklo leži velika rdeče rjava Harderjeva žleza ali globoka žleza tretje veke, ki napolnjuje velik del orbite in je večja od samega očesa. Ima enotno izvodilo, ki se odpira medialno za tretjo očesno veko. Izloča lipide, feromone in rdeči pigment porfirin, ki fluorescira pod UV svetlobo. Podgane imajo dve solzni žlezi, ekstraorbitalna leži ob bazi uhlja, infraorbitalna pa v kavdalnem delu orbite. Izvodili obeh se združita in odpirata v veznice v lateralnem delu očesa.

Podgane lahko slišijo ultrazvočne frekvence in jih tudi uporabljajo za komuniciranje. Kot pri večini glodavcev je bobnična votlina velika.

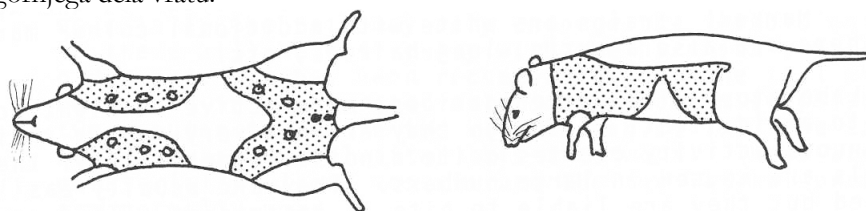
Pogane imajo zelo dober voh, olfaktorni režnji možganov so veliki, vohalni epitelij pa pokriva kar 50 % nosne sluznice.

MIŠ (*MUS MUSCULUS*)

Tako udomačene miške ljubljenci (fancy mouse) kot laboratorijski sevi izvirajo iz divje hišne miši *Mus musculus*. Osnovna razmerja med anatomskimi strukturami, zunanji zgled, reprodukcijski sistem itd. je zelo podoben podganam. Opisali bomo večje razlike.

Zunanost, koža

Miši delujejo vitkeje od podgan. Povprečna miš tehta 30 g. Dolžina repa variira med sevi, je redkeje odlakan kot trup. Anogenitalna razdalja je pri odrasli samici okoli 5 mm, pri samcu pa 15 mm. Tkivo mlečnih žlez je v dveh ločenih kompleksih. V področju kavdalnega abdomna in ingvinalnega področja sta dva para seskov, na torakalnem trije pari. Mlečne žleze segajo preko lateralne strani telesa do zgornjega dela vratu.



Slika 7. Kompleksi mlečnih žlez pri miši.

Skeletni sistem

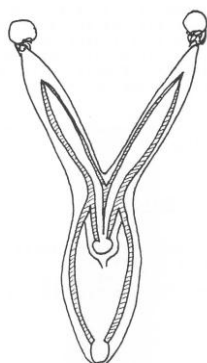
Zadnje okončine niso bistveno daljše od sprednjih in pri premikanju miške bolj tekajo kot poskakujejo, čeprav so sposobne tudi visokih skokov. Število vretenc je enako kot pri podgani, sternalnih reber je 5, zadnji dve sta prosti. Dimeljnična zrast (*symphysis pelvis*) je hrustančna in pred porodom se razklene. Medenico še vedno povezujejo ligamenti in po porodu se vrzel zmanjša, vendar nikoli ne povrne v prvotno stanje.

Prebavila

Leva polovica jeter je večja od desne, med obema medialnima režnjema je žolčnik (*vesica fellea*). Cekum je izrazito zapognjen, proti konici se zožuje, v trebušni votlini je večidel na levi strani, a nima stalnega položaja – odvisno od napolnjenosti črevesja. Podobno se spreminja položaj vranice, ki je sicer kot pri večini sesalcev v povezavi z veliko krivino želodca.

Spolni organi

Mišji samci imajo še izrazitejša mehurnice kot podganji, režnja se zavijata v obliki ovnovih rogov. Jajčnika sta pri samicah ob lateralni strani ledvic. Rogova se združita v navidezno enotno telo, ki pa je še vedno predeljeno s septumom. Le nekaj milimetrov pred koncem pa se oba kanala združita in *cervix uteri* ima enotno odprtino.



Slika 8: Shematska zgradba ženskih spolnih organov pri miši.

ČINČILA (*CHINCHILLA LANIGER*)

Naravni habitat činčila so suha skalnata območja J Amerike med 3000 in 5000 m n.v., možno je, da je v naravi izumrla (veliko so jih pobijali v 18. in 19. stoletju zaradi kožuha). Nekateri avtorji opisujejo tudi kratkorepo vrsto *C. brevicaudata*. V divjini živijo v večjih skupinah (do 100) in tudi ljubljencek mora imeti vsaj 1 kompanjona ali pa zelo veliko pozornosti, sicer postane depresiven. Življenjska doba je 15 let, izjemoma 30. Je nočno aktivna, v ujetništvu se lahko prilagodi na dan. Oče skrbi za zarod, le tik ob porodu ga odstranimo zaradi verjetne paritve.

Odrasla činčila je velika kot mlada mačka, vendar lahka (do 500 g). Ima zelo gost in mehak kožušček, iz enega dlačnega folikla raste do 60 dlak (vzreja za krzno!), le na repu so dlake ščetinaste. Nepravilen prijem, strah lahko povzroči t. i. "fur slip" - odpade dlaka večjega področja kože in traja nekaj mesecev, da se popolnoma obnovi. Ta mehanizem je vrsta obrambe pred plenilci. Za nego kožuha obvezno potrebujejo peščeno kopel za odstranjevanje lanolina. Naravna barva je temno siva, z nekoliko temnejšo glavo, obstajajo pa variacije od črnih, modrih, različnih sivin do krem in belih.

Ko je prestrašena, se lahko postavi na zadnje noge in pobrizga z urinom, sicer je skoraj brez vonja. Potrebujejo veliko večnivojsko kletko (rade plezajo in skačejo, spijo na polici) in dovolj materiala za glodanje. Idealna temperatura okolice je nizka oz. v naravi so izpostavljene velikim spremembam v temperaturi. Brez problemov prenašajo 0° C, če je suho in brez prepiha. Ne prenašajo visoke zračne vlage, nad 28° C doživijo toplotni udar. So občutljive na spremembo hrane. Krmimo komercialno hrano posebej za činčile in seno. Vlakinin naj bo 15 – 35 %. Posladkov mora biti malo (običajno je dodan šipek), nikakor to ne smejo biti koruza, arašidi in koščičasto sadje.

Oba spola imata 3 pare seskov (en ingvinalni, dva torakalna), moda niso v skrotumu, maščobno telo testisov je izrazito, mehurnica je zelo dolga, lahko tudi razvejana. Vagina je odprta le ob gonitvi in poganjanju mladičev. Ločevanje spola je zahtevnejše (ni vulve, ni skrotuma, urinarna papila samice je relativno velika).

Tanko črevo je dolgo 60 cm, cekum velik in zapognjen z več haustriami, debelo črevo je daljše od 100 cm, prva tretjina ima izrazite haustre, drugi dve tretjini pa sta tanki. Koprofagija poteka običajno od 8. do 14. ure.

Preglednica 1: Fiziološke vrednosti pri činčili.

Fiziološke vrednosti	
življenska doba v ujetništvu	8 – 15let (do 30?)
teža samec /samica	400 – 500 / 400 – 600 g
spolna zrelost	8 – 11 mesecev
tip reprodukcije	sezonsko poliestrična (nov – maj)
dolžina ciklusa	30 – 50 dni
ovulacija	spontana
trajanje brejosti	111 dni (105 – 118)
št. mladičev	2 (1 – 6)
teža mladičev ob porodu	30 – 50 g
odstavljanje	6. – 8. teden
rektalna temperatura	37 – 38°C
srčna frekvenca	100 – 150 / min

MORSKI PRAŠIČEK – BUDRA (*CAVIA PORCELLUS*)

Kar nekaj časa je bil morski prašiček sinonim za poskusno žival. Razlog za to gre verjetno iskati v zgodovini, saj je bila ta vrsta živali prva uporabljena v raziskavah sploh: v poskusu proizvodnje toplote že leta 1780. Žival z latinskim imenom *Cavia porcellus* so sicer udomačili že Inki, v naravi pa danes ne živi več.

Morski prašički so kompaktni, imajo kratek vrat, zadnje okončine so daljše od sprednjih, repa nimajo. Samčki tehtajo med 900 in 1200 g, samicke 700 – 900 g. Na sprednji okončini imajo 4 prste, na zadnji

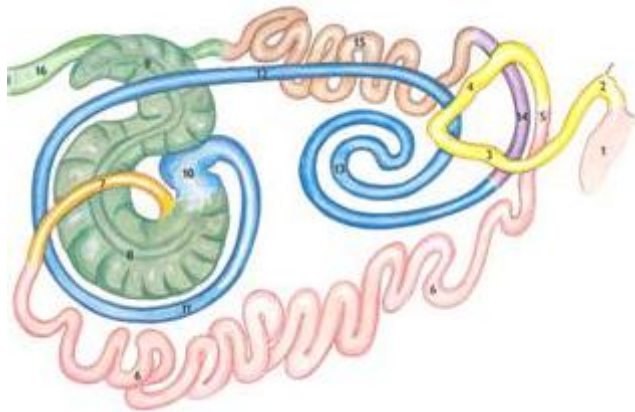
le tri (manjkajo 1. in 5. prst). Mlečne žleze so izoblikovane pri obeh spolih, v ingvinalnem področju je par seskov. Samec ima skrotalni zadebelitvi lateralno od anusa, penis je blizu anusa in reža povezuje anus in prepucialno odprtino. Samičke imajo v perinealnem področju režo oblike črke Y. Na bazi je anus. Med zgornjima krakoma je odprtina sečnice, na stičišču vulva, ki je v anestrusu zaprta z membrano. Ob strani sta dve perinealni vrečki z žlezami, ki sta pogosto polni oljnih izločkov, dlak in naslag.

Vretenc je 7 vratnih, 13 – 14 prsnih, 6 ledvenih, 3 – 4 križnih in 4 – 7 repnih. Zadnji dve rebri sta hrustančni. Dimeljnična zrast se razklene pri samicah 2 tedna pred porodom. Imajo 20 zob – poleg incizivov in treh molarjev imajo v obeh čeljustih par premolarjev. Vsi zobje so brez koreninski in stalno rastejo, molarji zgornje čeljusti se obračajo navzven, spodnje čeljusti pa proti jeziku.

Posebnosti

Kurloffove celice so edinstvena oblika levkocitov (opisane edino še pri kapibari), ki jih izloča timus pod vplivom estrogenov. Morfologija je podobna običajnim levkocitom, le da imajo izrazite kroglaste vključke – Kurloffova telesa. Največ jih je v krvnem obtoku in placenti brejih samic. Timus je pri mladih živalih zelo velik, leži v kranialnem mediastinumu in ventrolateralno na vratu. Vranica je velika, leži levo ob veliki krivini želodca.

Kavdalni del jezika je spojen z mehkim nebom in povezuje med prebavnim delom žrela in ostalim žrelom je majhno nebno ustje. Na straneh ga omejujeta gubi mehkega neba – velofariengealna zakotja. Želodec ima po vsej površini žlezno sluznico. Tanko črevo je na desni strani abdomna, dolgo približno 125 cm. Večino levega dela abdomna izpolnjuje cekum, ki je velika zelenorjava vreča s tanko steno, v kateri se lahko nahaja kar 65 % gastrointestinalne vsebine. Ima tri tenije in oblikuje izrazite haustre. Kolon je temnozeleno barve in dolg 70 cm. Anatomsko se deli na colon ascendens s tremi zankami, colon transversum in colon descendens. Funkcionalno pa se deli na proksimalni in distalni kolon. Začetnih 20 cm je proksimalni kolon, v notranjosti ima na mezenterični strani vzdolžen žleb z mukoznimi celicami, ki lovi bakterije in delce z visokovsebnostjo proteinov. Ti deli fecesa se z antiperistaltiko odplavljajo nazaj v cekum. Žolčnik je velik, leži v kvadratnem režnju. Pankreas je trikotne oblike, rožnato rdeč in ima tri režnje.



Slika 9: Shematsko predstavljeno črevesje budre.

1 ventriculus, 2 pars cranialis duodeni, 3 pars descendens duodeni, 4 pars ascendens duodeni, 5 flexura duodenojejunalis, 6 jejunum, 7 ileum, 8 corpus caeci, 9 apex caeci, 10 ampulla coli, 11 ansa sinistra coli, 12 ansa dextra coli, 13 ansa spiralis coli, 14 colon transversum, 15 colon descendens, 16 rectum

Samci imajo zelo razvite pomožne spolne žleze. Posebno velika, črvaste oblike je mehurnica, ki jo je mogoče zamenjati z maternico. Na bazi mehurnice sta razvejani koagulacijska žleza in dorzalni reženj prostate, ventralni reženj prostate leži pod sečnico. Skupina glodavcev *Caviomorpha* ima za posebnost vaginalno membrano. To je tanka prozorna epitelijska membrana, ki zapira nožnični vhod in se prekine le med parjenjem in poganjanjem mladičev. Takoj po končanem estrusu oz. če je prišlo do parjenja, takoj po izvrženem koagulacijskem (vaginalnem) čepu, se membrana spet zapre.

Koža ima veliko žlez lojnic, ki so najbolj izrazite po hrbtu in v okolici anusa. Slednje imenujemo perinealne žleze in so pri samcih razvite bolj kot pri samicah. Tretja očesna veka je zelo slabo razvita.

HRČEK (*CRICETUS CRICETUS*)

Hrček je verjetno najbolj klasičen mali glodalec, ki ga starši kupijo otroku. Klasični hrček ali navadni zlati hrček je *Mesocricetus auratus*. Zaradi velikega števila barvnih variacij ga v angleško govorečem področju danes namesto »golden« raje imenujejo »syrian hamster«. Zanimivo je, da je bil ta rod živali do leta 1930 praktično neznan, čeprav je bil pogost tudi v Evropi (pri Središču ob Dravi je npr. majhna populacija velikega hrčka). Današnji laboratorijski hrčki in ljubljenski vsi izvirajo iz majhnega števila živali, ki so jih ujeli na severozahodu Sirije (3 živali 1930, 11 1971 in še 3 1978). Sodijo v družino *Cricetidae*, kjer najdemo še voluharje, leminge in več podgan in miši Novega sveta.

Izrazita posebnost hrčka je obligatorna samotarskost (tudi par se ne razume) in psevdohibernacija (pri temperaturi pod 5° C, pa tudi pri zelo visokih temperaturah in kratkem dnevu). So nočno aktivne živali.

Morfološke posebnosti

Na bokih imajo hrčki dve področji lojnic (t. i. bočni organ), ki močno izločajo ob spolnem vznburjenju; pri samičkah so manjše. Oba spola imata 6 – 7 parov seskov. Imajo izrazite bukalne vrečke – mešičke za skladiščenje in prenašanje hrane. Napolnjena sega celo preko skapule. Vrečke so zelo vaskulizirane, ni pa limfnih žil, zato so kot imunopriviligirano in lahko dostopno mesto uporabne za raziskave. Želodec je tudi navzven vidno predeljen na žlezni in nežlezni del. V nežlezni je pH bistveno višji in ima posebno mikrofloro. Tanko črevo je dolgo, slepo črevo je dolgo in večkrat prepognjeno, nekaj zavojev oblikuje še navzgornji kolon. Ob normalnih klimatskih pogojih se velikost testisov zelo spreminja (sezonsko parjenje), samičke pa imajo najkrajšo dosedaj znano gestacijo pri sesalcih: 15 – 18 dni.

Druge vrste hrčkov

Mali hrček – *Phodopus spp.* izvira iz Sibirije, Mongolije in severa Kitajske. V laboratorijskih raziskavah so ga začeli uporabljati za raziskave fotoperiodizma in češarike. Ker so po naravi bolj socialni od navadnega hrčka, so postali predmet trgovine z malimi živalmi. Nastanitev je torej možna v parih ali manjših skupinah, primerna kletka zanj pa je akvarij z mrežastim zgornjim delom. So namreč zelo majhni (samičke 30 g, samčki 40 – 50 g), da se zrinese skozi reže običajnih kletk. Vrste, ki so poznane, so *P. campbelli* (mali ruski hrček, tudi đungerijski), *P. sungorus* (ruski hrček, beli zimski hrček ali đungerijski) in *P. roborovskii*. Za *P. sungorus* je značilno, da pod vplivom fotoperiode in/ali skrajšanega dneva postane bele barve, sicer je bel samo trebušek, hrbet pa v sivorjavih odtenkih. Ti hrčki tudi ne hibernirajo, ampak pri padcu temperature zmanjšajo telesno težo in vsak dan za 4 – 8 ur padejo v torpor. Poleg bočnih žlez imajo še ventralno trebušno lojnico.

Sivi ali kitajski hrček *Cricetus griseus* je bil uporabljen v raziskavah na Kitajskem že 1919, v ZDA pa so po drugi svetovni vojni ugotovili njihovo uporabnost zaradi dednega diabetesa. Uporabni so tudi v genetiki zaradi majhnega števila kromosomov (22). So majhni (30 – 35 g) in manj socialni kot mali hrčki, posebno samičke so agresivne in je priporočljiva samostojna nastanitev.

Hrčki so ponoči zelo aktivni, v naravi bi prepotovali velike razdalje, zato je zelo priporočljiva namestitev kolesa. So omnivori, priporočljiv odstotek proteinov je 16 %, OH 60 – 65 in maščob 5 – 7 %.

GERBIL (MONGOLSKA PUŠČAVSKA PODGANA – *MERIONES UNGULICATUS*)

Gerbili oz. mongolske puščavske podgane živijo predvsem v visokogorju Mongolije, v južni Sibiriji in severni Kitajski, kjer je podnebje polpuščavsko ali stepsko. Mongolski skakač, kot žival pogosto imenujejo, ni pravilno ime, saj spada v poddružino tekačic - *Gerbillinae*. Za preživetje v polpuščavah in stepah imajo več prilagoditev: varčujejo z vodo, lahko pijejo slano vodo in dlje časa zdržijo brez vode. Poleg tega njihovi zobje ves čas rastejo in so primerni za drobljenje trdih semen, noge pa so prilagojene na skakanje in beg pred plenilci. Z meritvami porabe kisika in njihovega metabolizma so pokazali, da se lahko prilagodijo na velik razpon v temperaturi in vlažnosti. Pri nižjih temperaturah so aktivni in ne hibernirajo.

V biomedicinskih raziskavah so jih uporabljali že zelo zgodaj, v ZDA že okrog leta 1950 kot del programa za odkrivanje novih živalskih vrst za uporabo v biomedicinskih raziskavah. Zanimivi so bili zato, ker se hitro in brez vidnih znakov stresa privadijo na novo okolje, potrebujejo malo nege in izločajo male količine urina, kar pomeni, da so njihove celice bolj suhe in imajo manj vonja. Poleg tega so zanimivi za opazovanje, redko grizejo in nimajo izrazitega vonja. Pri rokovanju z njimi lahko pride le do oguljenja repa. Uporabljali so jih predvsem na področju farmakoloških raziskav (vpliv različnih substanc na metabolizem), raziskav raka (levkemija, študij spremembe barve kože po indukciji s kemičnimi karcinogeni), preučevali so tudi okužbe s paraziti in bakterijami, kot npr. *Echinococcus*, *Toxoplasma*, *Mycobacterium leprae*, *Bordetella bronchiseptica*, in jih uporabili v virusnih raziskavah. Ugotovili so tudi, da prenesejo velike količine sevanja. Za raziskave so bili zanimivi tudi zato, ker se njihov metabolizem holesterola razlikuje od drugih živali. Pretvorba holesterola v steroidne hormone je pomembnejša kot pot metabolizma holesterola pri podgani. Prav tako je drugačen metabolizem nadledvične žleze. Nadledvična žleza je bogata z lipidi, proizvaja pa le manjše količine kortikosterona, ki je pri drugih sesalcih največji produkt nadledvične žleze.

V naravi živijo v kolonijah do 20 živali, v podzemnih rovih. Aktivni so podnevi in ponoči. Komunicirajo z markirnimi žlezami in udarjanjem z nogo v tla. So dnevne živali, spijo ponoči. Kot laboratorijske živali so aktivni, radovedni in nežni. Glede na temperaturo okolja spijo v različnih položajih – pri višjih temperaturah (30 °C) na hrbtu, z nogami v zraku, pri srednjih (25 °C) na boku in pod 25 °C v sedečem položaju z glavo med zadnjimi okončinami. Samice so težke 700–100 g, samci 80–110 g. Njihova velikost je 100–120 mm, dolžina repa pa 120 mm. Njihova življenjska doba je 1–2 leti.

Njihova glava je kratka in široka, oči so črne, rahlo izbočene ter nameščene precej na straneh, tako da imajo široko vidno polje, lociranje predatorja pa je zaradi tega manj natančno. Zato živali v izvidniški drži glavo premikajo gor in dol, da ugotovijo, kje se nahaja potencialni predator. Uhlji so majhni, okrogli in položeni rahlo nazaj. Dolžina lobanje je 40 mm, na smrčku imajo dolge vibrise. Grizne ploskve molarjev so podobne kot pri činčilah. Sprednje tačke s po štirimi kremplji so prilagojene za tek, skakanje in prijemanje, zadnje s po petimi kremplji pa za tek, skakanje in izvidniško držo ter držo pri hranjenju. Zadnje okončine so malo daljše od sprednjih. Podplati so popolnoma odlakani, razen dela blizu pete. Kremplji so temno rjavi ali črni. Po vsem telesu so odlakane, dlako imajo tudi na zadnjih podplatih. To jih ščiti pred suhim mrazom in vročim peskom, ki sta značilna za območja, na katerih živijo. Dlaka je večinoma svetlo rjava, siva na korenu in včasih temnejša na konici. Na trebuščku je dlaka svetlejša, lahko bela, na hrbtu pa temnejša. Dorzalne in ventralne dlake so dolge okrog 10 mm, na repu manj, razen na konici, kjer so dolge do 20 mm. Svetlejša dlake so okrog oči in ušes. Dlake na gobčku so mešane, črne in bele, dolžine 5–40 mm. Rep predstavlja več kot 90 odstotkov dolžine glave in telesa. Je odlakan, na koncu ima čopek iz temnejših dlak.

Ventralna markirna žleza je zelo izrazita in ima pomembno funkcijo v reprodukciji in teritorialnem obnašanju. To je oranžno področje brez dlak na sredini trebuha, z njegovo pomočjo markirajo okolico. Pri samcih se lahko zelo poveča in hipersekretira. Aktivna postane po nastopu spolne zrelosti.

Samice se lahko razmnožujejo celo leto. Ugotovitev uspešnosti parjenja je mogoča s pomočjo kopulatornega čepka. Brejost traja 21–28 dni. Mladiči so težki 2,5–3,0 g, skotijo se rožnati in goli z zaprtimi očmi, ki se odpro med 16. in 20. dnem, in zaprtimi ušesi, ki se odpro pri starosti 5 dni. Mati jih odstavi pri starosti 20–30 dni, ko že lahko jedo semena. Spolna zrelost nastopi pri 70–85 dneh pri samcih in med 65. in 85. dnem pri samicah. Testisi se spustijo že med 28. in 45. dnem, vagina pa se odpre med 40. in 76. dnem. Samice imajo 4 pare seskov. Dolžina estrusnega cikla je 4 do 6 dni. So poliestrične živali in imajo estrus takoj po porodu. V leglu je ponavadi 4–6 mladičev (lahko 1–12), navadno več samčkov kot samičk. Določitev reprodukcijskega stanja je pri samicah možna s pregledom vaginalnega brisa (proestrus: celice z jedrom, estrus: poroženele celice, metestrus: poroženele celice in levkociti, diestrus: epiteljske celice in levkociti).

KUNEC (*ORYCTOLAGUS CUNNICULUS*)

Divji kunec *Oryctolagus cuniculus* prvotno izhaja iz Iberskega polotoka in udomačevali so ga že Rimljani. Z ljudmi se je kot lovna divjad razširil po celotni Evropi, naselili pa so ga tudi v Južno Ameriko, Avstralijo in Novo Zelandijo. Priznanih je tudi preko 70 pasem udomačenih kuncev. Prvič so poskuse na kuncih delali leta 1852, krmili so jih z volčjo česnjo, ki nanje nima večjih učinkov, saj so sposobni sintetizirati atropinesterazo.

Ne spada med glodavce, temveč med lagomorfe. Najbolj očitna razlika med glodavci ter lagomorfi je v zobovju. V zgornji čeljusti imajo lagomorfi dva para incizivov. Prvi par (*incisivi major*) je podoben glodavskemu, drugi par je manjši (*incisivi minor*) in postavljen za prvim, tako da predstavlja podporna glodača. V spodnji čeljusti je en par incizivov. Nadalje so v zgornji čeljusti 3 pari premolarjev, 3 molarjev (zadnji je majhen), v spodnji čeljusti pa 2 para premolarjev in 3 molarjev. Vsi zobje so brez koreninski in rastejo približno 2 mm na teden.

Zunanost

Kakovost in barva kože je odvisna od pasme. Na smrčku, skrotumu in ingvinalni regiji so brezdlčna področja. Namesto podplatnih blazinic imajo na prstih in stopalu gost grob kožuh (*pili lanei metacarpales et digitales*). Usta so majhna, s smrčkom jih povezuje philtrum (zajčja ustnica). Imajo izrazite čutilne dlake – *pili labiales maxillares*, *pili mentales*, *pili zygomatici*, *pili infraorbitales* in *pili supraorbitales*. Uhlji so odlakani z nežnejšo dlako in predstavljajo 12 % telesne površine. Na njih so dobro vidne žile: *a./v. auricularis rostralis* in *a./v. auricularis caud.* z vejami *rostr.*, *intermedi.*, *caud.* Na vratu se oblikuje kožna guba – podbradek, ki je izrazitejši pri samcih in nekaterih pasmah.

Lateralno od anusa in kroglaste odprtine prepucija imajo samci podolgovate skrotalne vrečke. Vulva samičk je trikotaste oblike z vzdolžno režo. V perinealni regiji so pri obeh spolih ingvinalne žleze z voskastim izločkom. Za socialno komunikacijo uporabljajo še analne in submentalne žleze. Mlečne žleze (običajno 8 parov) so v torakalni in ingvinalni regiji, seske imajo samo samice.

Lokomotorni sistem

Okostje je pri udomačenih kuncih zelo nežno v primerjavi s telesno (mišično) maso. Nepravilno ravnanje lahko povzroči zlome hrbtenice, posebno pri mladih živalih, predilekcijsko mesto je med šestim in sedmim ledvenim vretencem. Vertebralna formula je C7, T12 – 13, L7, S4, C15 – 16. Sedem reber je sternalnih, zadnja so prosta (2-3). Prsnica je dolga, ozka in ima izrazit *processus xyphoidens*.

Kosti lobanje imajo več luknjičastih ploskev, najbolj izrazita je *facies cribrosa maxillae*. Dodatne strukture: izrazita *crista nuchae* štrli kavdalno, *protuberantia occipitalis ext.*, *proc. angularis mandibulae*, *proc. zygomaticus ossis frontalis*, *tuber faciale*, lok nad orbito, ki ima spredaj *incisura supraorbitalis cran.*, zadaj *incisura orbitalis caud.* *Meatus acusticus externus* je širok, velika je tudi *incisura palatina*. V orbito sega *tuber alveolaris maxillae*.

Skapula je trikotne oblike, *acromion* ima izrazita *proc. hamatus* in *suprahamatus*. Izrazita je ključnica – *clavicula*. Ulna je močnejša od radiusa. Na sprednji okončini je 5 prstov (1. je krajši), imajo dolge kremplje, na prvih prstnih sklepih sta po dve sezamoidni koščici. Kolčnici sta dolgi in ozki, acetabulum je kroglast, sooblikuje ga pomožna kost *os acetabuli*. Fibula se distalno zraste s tibio, petnična grča je izrazita, tarsus leži na tleh (glede na zadnjo okončino je plantigrada žival, vendar pri hitrem teku ravno tako vzdigne okončino na prste). Na zadnji okončini so 4 prsti, v kiti *m. gastrocnemius* sta dve sezamoidni kosti, v kiti *m. popliteus* pa ena.

Poleg že »znanih« mišic pri domačih sesalcih so pri kuncu izoblikovane še: *m. zygomaticoauricularis*, *m. depressor anguli oris*, *m. zygomaticoscutularis*, masseter ima izrazit *pars profunda*, *m. pterygoideus med.* se deli še na lateralni in medialni del, ima močno *m. cutaneus trunci*, ki se navezuje na *corpus adiposum interscapulare* in *corp. adip. inguinale*, *m. cleidomastoidens* in *m. cleidobrachialis* se ločita (zaradi ključnice), *m. deltoideus* ima *pars spinalis* in *pars acromialis*, *m. abductor cruris cran.*, *m. adductor brevis*, *m. adductor brevis magnus*, več ekstenzorjev prstov in kakšen dodaten fleksor.

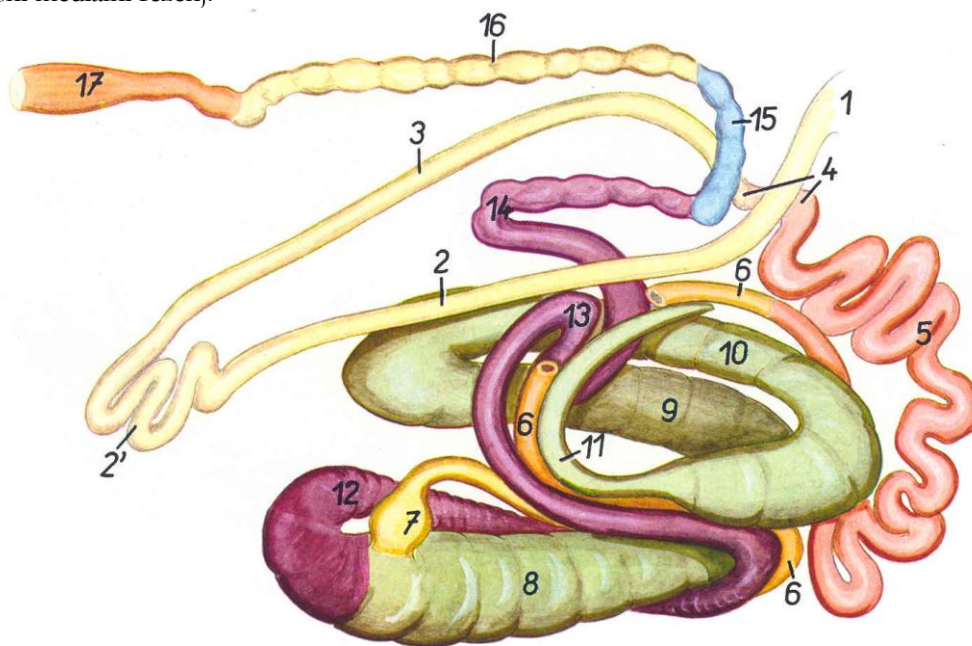
Prebavila

Ima dolgo mehko nebo, epiglotis ima mediano zarezo, orofarinks je ozek, ima izoblikovane tonzile. Jezik je zelo dolg, na kavdalnem delu ima vzvišek *torus lingualis*. Slinske žleze so štiri: velika podušesna, okrogla spodnječeljustna, v ustnem kotu je vidna lična, pod orbito pa še *gl. zygomatica*.

Požiralnik ima prečnoproasto muskulaturo po celotni dolžini, nima pa mukoznih žlez. Želodčna kardija ima izrazit sfinkter, ki onemogoča bruhanje. Želodec ima tanke stene, v kardialen področju je sluznica brezžlezna, vratarjev sfinkter je močan in hrana se v želodcu dolgo zadržuje. Tanko črevo je razmeroma kratko (tu se zadržuje do 12 % gastrointestinalne vsebine). Duodenum je na zavoju zanke (*pars transversa duodeni*) dodatno zavito, na prehodu v jejunum je *flexura duodenojejunalis*. Jejunum ima obsežen mezenterij. Poleg ileuma ležita *ansa spiralis coli* in *appendix veriformis* (povezuje jih *plica caecocolica*), na kocu ileuma je izrazita *ampulla ilei*, ki jo pri kuncu imenujemo *sacculus rotundus*.

Slepo črevo je zelo dolgo, ima izrazite haustre in tanko steno. Sprva je široko, nato se počasi oži. V njem je 40 % gastrointestinalne vsebine, izpolnjuje celoten ventralni del trebušne votline. Na njem ločimo *gyrus primus*, *g. secundus*, *g. tertius* in *appendix veriformis* (slepič). Slepič je bogat z limfatičnim tkivom in izloča bikarbonat. Colon se deli na *colon ascendens* in *anso proximalis*, zavito *anso centralis* (na mestu, ko se loči od ileuma) in *anso distalis* (za tem mestom so vidni bobki). Pred rektumom je še kratek *colon sigmoideum*. Funkcionalno razdelimo kolon na proksimalni (s tenijami in haustrami) in distalni (brez tenij), meja med njima je *fusus coli*, 5 – 8 cm dolgo področje z močno cirkularno mišico, debelo sluznico in ganglijskimi pleteži, ki uravnava izločanje trdih in mehkih bobkov.

Pankreas je majhen, nepravilne oblike, ima desni in levi reženj, levi leži ob želodcu. Izvodilo se izteka v distalni duodenum, 35 – 40 cm za izlivom žolčevoda. Jetra so izrazito razdeljena, kvadratni reženj je velik, repati reženj ima *proc. caudatus* (na sredini) in velik *proc. papillaris* (levo). Žolčnik je globoko potisnjen v desni medialni reženj.



- | | | |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 1 ventriculus | 7 ampulla ilei (sacculus rotundus) | 12 colon ascendens |
| 2 pars descendens duodeni | 8 gyrus primus caeci | 13 ansa centralis coli ascendens |
| 2' ansae caudales duodeni | 9 gyrus secundus caeci | 14 ansa distalis coli ascendens |
| 3 pars ascendens duodeni | 10 gyrus tertius caeci | 15 colon transversum |
| 4 flexura duodenojejunalis | 11 appendix veriformis | 15 colon descendens |
| 5 jejunum | | 17 rectum |
| 6 ileum | | |

Slika 10: Shematska predstavitev črevesja pri kuncu.

Dihala

So obligatorni dihalci skozi nos, smrček trza hkrati s frekvenco dihanja ali hitreje, ko je žival umirjena pa miruje. Na področju smrčka so senzorična področja in je zelo občutljiv. Prsni koš je ozek v primerjavi s prostornino trebušne votline. Pleura je zelo tanka in ne oblikuje septumov med pljučnimi režnji. Desni del pljuč je razdeljen na *lobus cranialis*, *l. medialis*, *l. caudalis* (z neizrazito zarezo) in *lobus accessorius*, na levi pa je *lobus cranialis* razdeljen na kranialni in kavdalni del, *lobus caudalis* je enoten. Pri dihanju v mirovanju ne uporabljajo interkostalnih mišic, poglavitna je diafragma.

Ledvice

So fižolaste oblike, imajo eno papilo. Desna leži bolj kranialno.

Moški spolni organi

Penis je kratek, obrnjen kavdalno, nima koščene osnove. Moda se spustijo po 10. tednu starosti, so relativno velika z velikimi maščobnimi telesi ob epididimisu. Pristne so vse tri akcesorne spolne žleze. Prostato delimo še na dorzalni in ventralni del, sprednji del pa različni avtorji označujejo kot del mehurnice, preprostato ali koagulacijsko žlezo.

Ženski spolni organi

Jajčniki so podolgovati in postavljeni relativno kavdalno glede na ledvice. Jajcevod je zelo dolg. Kunci imajo pravi *uterus duplex*, ki oblikuje ločena *ostium uteri* in *cervix uteri*. V mezometriju je velika količina maščobe. Sečnica se odpira v nožnični predvor.

Kardiovaskularni sistem

Srce je bolj koničaste oblike in nekoliko manjše kot pri drugih živalih. Desna zaklopka ima le dva škrica (ni trikuspidalna). Prevodni sistem srca je zelo enostaven. *Truncus brachiocephalicus* se razdeli na *a. subclavia dex.* (največja), *a. carotis comm. sin.* in *a. carotis comm. dex.*. *A. subclavia sinistra* se oddeli od aortnega loka posebej. *V. jugularis interna* in *externa* ter *a. carotis int.* in *ext.* nimajo anastomoz. Nevtrofilni granulociti se obarvajo rožnato in jih imenujemo heterofilci. V krvi ima tudi nenavadno visoko število bazofilnih granulocitov, do 30 % vseh levkocitov. Do 60 % bele krvne slike predstavljajo limfociti. Ob infekcijah se ne poveča skupno število levkocitov, ampak je izrazita heterofilija.

Imunski sistem

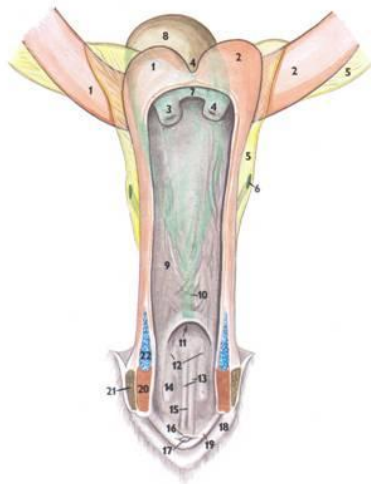
Tipljive bezgavke so *lnn. mandibulares cran. et caud.*, *lnn. poplitei*, *lnn. subiliaci* in *lnn. inguinales superficiales*. Timus ostane velik tudi pri odraslih živalih in napolnjuje kranialni mediastinum. Vranica je majhna in sploščena. Izrazito limfatično tkivo je v tonzilah, ob delih črevesja *sacculus rotundus*, *appendix veriformis* in v Payerjevih ploščah, predstavlja kar 50 % celotnega limfatičnega tkiva in verjetno kompenzira majhno vranico.

Možgani in čutila

Možgani so zelo konični – *bulbus olfactorius* je kranialno izrazito podaljšan. Hemisferi sta slabo nagubani, velik je *lobus piriformis*, ob straneh malih možganov sta navidezno ločena podaljška *parafloculi*. Oči so postavljene zelo lateralno in izbočene, s premikanjem zrkel pokrijejo 360°. Tretja veča prekrije 2/3 vidnega zrkla. Solzna žleza je velika in leži medialno, vendar njen sekret ni zelo pomemben. Zelo velika je Harderjeva žleza, ki leži medialno v orbiti, ima dva režnja, izvodilo pa za tretjo veko. Pri samcih je večja in se še poveča v paritveni sezoni. Imenujejo jo tudi globoka žleza tretje veke za razliko od (površinske) žleze tretje veke, ki leži kranialno, izvodilo pa ima na podobnem mestu.

Nadledvični žlezi

Ležita kranio-medialno od ledvic, leva ob *a. mesenterica cran.* in desna tik ob *v. cava caud.*



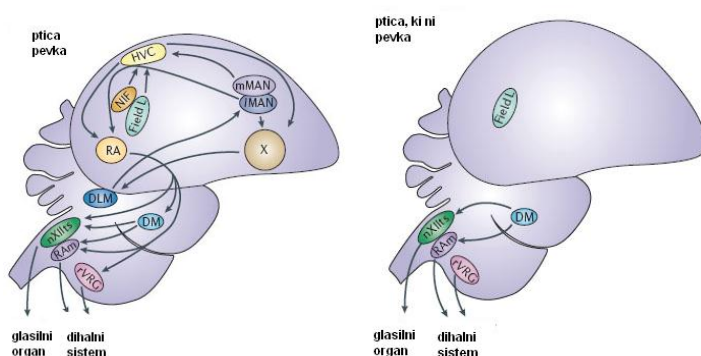
Slika 11: Nožnica in dvojni maternični vrat pri kunčici.

1, 2 *cornu uteri sinister, dexter*, 3, 4 *portio vaginalis uteri*, 5 *lig. latum uteri*, 6 *ureter dexter*, 7 *velum uteri*, 8 *vesica urinaria*, 9 *vagina*, 11 *ostium urethrae externum*, 12 *vestibulum vaginae*, 14 *glandula vestibularis major*, 16 *praeputium clitoridis*, 17 *clitoris*, 21 *glandulae praeputiales*

LITERATURA

1. Feldhamer GA, Drickamer LC, Vessey SH, Merritt JF. Mammalogy: adaptation, diversity and ecology. New York: McGraw-Hill Education, 2003.
2. Macdonald D, ed. Velika enciklopedija. Sesalci. Ljubljana: Mladinska knjiga, 1996.
3. O'Malley B. Clinical anatomy and physiology of exotic species. Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2005.
4. Popesko P, Rajtova V, Horak J. Colour atlas of anatomy of small laboratory animals. 2 volumes. London: Elsevier Saunders, 2002.

Ptice in primati niso običajne laboratorijske živali. V poskusih se uporabljajo predvsem zaradi njihove inteligence. Papige imajo sposobnost posnemanja človeških glasov ter vokalnega učenja, ki je prvi pogoj za razvoj govora pri človeku in ga ne najdemo pri drugih sesalcih. Afriške sive papige so se sposobne naučiti človeških besed in jih uporabiti v vzajemnem pogovoru s človekom. Nekatere ptice, npr. vrane, so sposobne izdelati orodje, da pridejo do hrane, s socialnim vedenjem so to sposobne naučiti tudi druge. Zaradi te lastnosti so postale podobne primatom, npr. šimpanzom, ki so prav tako sposobni izdelati orodje, da pridejo do hrane. Golobi si lahko zapomnijo več kot 725 vidnih vzorcev, lahko ločijo naravne stvari od tistih, ki jih je ustvaril človek, stile slikanja ter so sposobni komunikacije s pomočjo vidnih simbolov. Opažanja glede inteligence ptic so bila potrjena v več člankih, objavljenih v uglednih znanstvenih revijah. Jarvis in sod. (Nature Rev Neurosci 2005) so pokazali, da ima ptičji palium podobno funkcijo kot neokorteks človeka. Odkritja so spremenila teorijo, da se v ptičjih možganih nahajajo le bazalni gangliji, ki so vključeni v instinktivno vedenje. Primer, kako je palium ptic pomemben za zmožnost izvajanja zapletenih vzorcev, so jedra, ki vplivajo na sposobnost petja, t. i. »song control nuclei«. Ti deli so še posebej pomembni pri pticah selivkah kjer je sezona parjenja povezana z oglašanjem. Razlika med možgani ptic, ki so sposobna petja, in tistimi, ki niso, je očitna.



Slika 1: Možganska jedra pri pticah pevkah in pticah, ki ne pojejo.

Okrajšave za jedra: DLM – nucleus dorsolateralis anterior, pars medialis; DM – dorzomedialni nukleus nukleusa intercollicularisa; IMAN – lateralni magnocelularni nukleus anteriornega nidopaliuma; mMAN – medialni magnocelularni nukleus anteriornega nidopaliuma; NIF – mejna ploskev nukleusov nidopaliuma; nXIIIs – tracheosiringealni del nukleusa hypoglossusa; RA – robustni nukleus arcopaliuma; Ram – nukleus retroambigualis; rVRG – rostroventralna respiratorna skupina; X – skupina X. (Povzeto in prirejeno po: Bolhuis, JJ, Gahr, M. Neural mechanisms of birdsong memory. Nat Rev Neurosci 2006; 7: 347–57).

PTICE

Ptice uporabljajo v različnih raziskavah na področju endokrinologije, farmakologije, toksikologije, imunologije, genetike, vedenjskih študij, nevrofiziologije, kardiovaskularne fiziologije, fiziologije mišic in metabolizma. Prepelice (*Coturnix coturnix*), majhne, nežne, odporne, prilagodljive ptice, ki jih je lahko nastaniti in ekonomsko vzdrževati, uporabljajo predvsem v raziskavah razvojne biologije, bazalnih študijah na področju učenja, motivacije ter socialnega obnašanja. Domačo kokoš (*Gallus domesticus*) so uporabljali predvsem za proizvodnjo protiteles, raco (*Anas platyrhynchos*) in purana (*Meleagris gallopavo*) bolj v ZDA, avstralske zebrice (*Taeniopygia guttata*) so najbolj pogoste v laboratorijih, uporabljali so tudi skobčevke (*Melopsittacus undulatus*), kanarčke (*Serinus canaria domestica*) in golobe (*Columba livia domestica*).

Anatomske posebnosti ptic

Morfološke razlike med posameznimi družinami ptic so majhne, kar je najbrž posledica edinstvene prilagoditve morfologije na letenje. Obstajajo razlike glede okostja, glasilnega organa, slepih črev, oči ipd. V osnovi jih glede na obliko prsnice razdelimo na tekače in letače. Druga delitev pa se nanaša na obliko čeljusti, glede na to jih delimo na staročeljjustnice *Paleognathae* in novočeljjustnice *Neognathae*.

Za ptice je značilna endotermija in zelo visok metabolizem. Njihova telesna temperatura je za 3–4 °C višja kot pri sesalcih. Normalna telesna temperatura se giblje med 40 in 41 °C.

Najbolj očitna značilnost ptičjega skeleta je preobrazba sprednjih okončin v krila. Na splošno je skelet lahek (10 odstotkov telesne teže), nekatere kosti so pnevmatizirane. Ptice, ki lahko letijo, imajo veliko prsnico, ki služi za nasadišče močnih letalnih mišic. Staročeljjustnice imajo karino (gredelj). Pri tekačih je prsnica fiksirana, nima karine in ima obliko splava. Največjo mišično maso pri pticah, ki letijo, (20 odstotkov telesne mase) predstavljajo letalne ali prsne mišice. Najpomembnejše so *mm. pectorales*, ki povešajo krilo, in *m. supracoracoideus*, ki vzdiguje krilo.

Dihalni sistem je zelo specializiran. Pljuča so rigidna, paleopulmonični parabronhiji, ki predstavljajo funkcionalni del pljuč, so paralelni, tok zraka poteka le v eni smeri. Imajo masiven sistem zračnih vrečk, večina ptic jih ima 8 (vratno, ključnično, dve kranialni prsni, dve kavalni prsni in dve trebušni), kar poveča anatomsko mrtev prostor v dihalnem sistemu. Zato je potrebno pri inhalacijski anesteziji zelo paziti na zadovoljiv dovod plinov. Pljuča se napihnejo pri premikih prsnega koša s pomočjo interkostalnih mišic. Nimajo diafragme, njihova telesna votlina je enotna, sicer delno predeljena na votline za zračne vrečke, perikard in jetrne režnje, in jo imenujemo celom, zato moramo pri ravnanju s pticami biti še posebej pazljivi.

Za gastrointestinalni sistem ptic je značilno, da imajo ustno-žrelno votlino (*oropharynx*), požiralnik z golšo (*ingluvies*), žlezni želodec oz. žlezovnik (*proventriculus*) in mišični želodec oz. mlinček (*ventriculus muscularis*), ki sta ločena, tanko in debelo črevo s slepim(-a) črevesom(-a) ter končni izliv v kloako. Imajo skupno anogenitalno odprtino – kloako, kjer se končujejo črevesje, urinarni trakt in produkti genitalnih organov. Na dorzalnem delu se nahaja limfni vozlič Bursa fabricii, kjer poteka zorenje limfocitov B.

Nefroni v ledvicah so kratki (plazilski tip) ali dolgi s Henlijevimi zankami (sesalski tip), kar kaže na to, da imajo ptice manjšo sposobnost koncentracije urina in s tem varčevanja s tekočinami kot sesalci. Za ledvični portalni krvni sistem je značilno, da ledvice prejemajo kri tudi iz zadnjih delov telesa (*v. iliaca ext.*, *v. iliaca int.*, *v. ischiadica*), kar pomeni, da vse substance, ki jih apliciramo v nogo, najprej potujejo v ledvico, kar je lahko nevarno.

Tudi za kožo ptic so značilne različne modifikacije. Kožne plasti so tanjše kot pri sesalcih. Skozi kožo se vrši splošna difuzna holokrina lipidna sekrecija kože, ki je namenjena vzdrževanju ravnovesja tekočin in omejenemu izhlapevanju, saj nimajo znojnic in lojnic. Imajo posebno razvite čute za UV svetlobo. V ptičjem perju, ki je derivat kože, se akumulirajo toksični produkti, kot sta npr. svinec, srebro.

Njihova reprodukcija poteka z jajci. Pri pticah se večinoma razvije le levi reprodukcijski sistem. Desnega ni ali pa je zelo zakrnel. Jajčnik in jajcevod se v valilni dobi močno povečata.

Ptice so v primerjavi s sesalci hiperglikemične. Raven glukoze v krvi 20 mmol/l je lahko normalna. V trebušni slinavki je malo Langerhansovih otočkov. Eritrociti in trombociti imajo jedra. Sekrecija soli poteka preko posebne žleze, ki leži nad očesom in se imenuje solna žleza (*glandula nasalis*). Še posebej je razvita pri morskih pticah.

Glasilni organ (*syrinx*) se večinoma nahaja na bifurkaciji traheje. Niz izdihov povzroča žvrgolenje, sodelujejo pa tudi trebušne mišice.

Najpogostejši odziv ptic na človeka je strah, zato je potrebno pazljivo ravnanje, da se izognemo nepotrebnemu stresu, ki bi lahko vplival tudi na rezultate. Pticam pokrijemo oči, s čimer lahko dosežemo sedacijo brez sedativov, z njimi ravnamo v rahlo zatemnjenem prostoru, krila in kljun fiksiramo (nekatero ptice napadejo oči), lahko uporabimo rahel pritisk na prsni koš.

PRIMATI (*PRIMATES*)

Poskuse, ki vključujejo primata razen človeka, so opravljali in nekatere še vedno opravljajo, vendar v manjši meri, na področjih toksičnosti različnih medicinskih in nemedicinskih pripomočkov, študija infekcijskih bolezni (HIV, hepatitis), nevroloških študij, študija obnašanja in poznavanja, študija reprodukcije, genetike in ksenotransplantacije (prenosa tkiv iz živali na človeka).

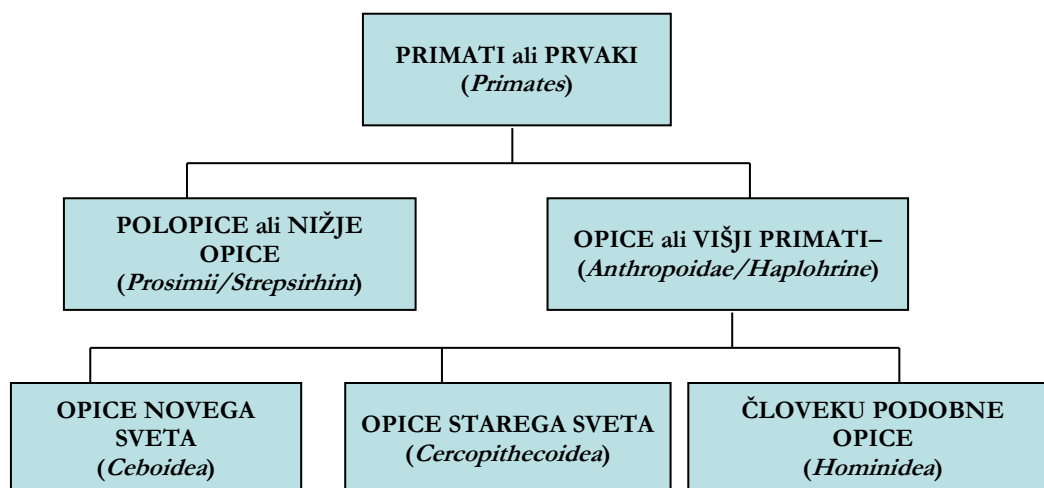
Obstaja le malo institucij, kjer je delo z opicami dovoljeno. Problematičen ni samo etični vidik uporabe opic v poskusne namene, še posebej z vidika podobnosti človeku, marveč tudi dejstvo, da so živali neudomačene, tiste, ki ne živijo v institucijah, potrebujejo posebej izučeno osebje za delo z njimi, nekatere vrste so zaščitene, živijo dolgo časa, njihova ponovna uporaba je pogosta, če jih ujamejo v divjini, se ne obnesejo dobro, hitro poginejo ter so zelo nagnjene k stresu. Potrebne so posebne kletke. Primati so nagnjeni k pretepom, zato je še posebej pomembna obogatitev okolja. Z njimi je potrebno ravnati zelo previdno. Lahko so prenašalci bolezni, kot so npr. herpes virus B, človeški herpes, HIV itd., zato z njimi stalno ravnamo, kot da so potencialni prenašalci bolezni.

Anatomske posebnosti primatov

Definicija primatov ni enostavna, saj ni značilnosti, ki bi bila skupna vsem, hkrati pa bi bila edinstvena samo zanje. Očitne lastnosti, kot so dve prsni bradavici, viseč penis, binokularni vid, ključnica, palec, imajo tudi nekatere druge skupine živali. Razlike med primati so odraz prilagoditve na zelo različne načine življenja.

Možgani so relativno veliki. Dlan je prilagojena za prijemanje, zato se palec postavi pravokotno na ostale prste. Oblikovane so občutljive blazinice in nohti. Postavljajo se vedno bolj pokonci, čemur sledi hoja po dveh nogah. Temu je prilagojena oblika prsnega koša, medenica je krajša, medenične kosti pa se razširijo. Očnica je zaprta, oči so obrnjene naprej, kar omogoča binokularni vid. Smrček in vohalni del možganov se zmanjšujeta. Zmanjšuje se tudi reprodukcijska sposobnost, imajo manj mladičev, ti pa so dlje časa odvisni od matere. Večina jih živi v tropskih ali suhih gozdovih toplih območij. Večinoma so omnivori. So evolucijsko uspešni tudi zaradi razvite zapletene socialne interakcije. Zelo redki so samotarci. Za vzdrževanje socialnih ureditev veliko komunicirajo. Najbolj enostaven način, bolj razvit pri polopicah, je markiranje. Sicer imajo vse vrste govorico telesa in izrazito mimiko. Večina jih je tudi zelo glasnih.

Primata razdelimo v podred polopice in opice.



Slika 2: Taksonomija primatov.

Polopice

Polopice delimo na lemurge in lorije. Vsi so drevesne vrste. Imajo manjše možgane, bolj razvit rhinencephalon (voh). Smrček je gol – *rhinarium*. Maternica je dvorožna, placenta pa neinvazivna

epiteliohorialna. Imajo posebno oblikovane sekalce in podočnike v spodnji čeljusti – t. i. zobni glavniček.

Opice ali višji primati

Za razliko od polopic imajo suhe kosmate smrčke, lopatičaste sekalce, *uterus simplex*, hemohorialno placento, večje možgane s poudarkom na vidnem sistemu, na splošno bolj ploske obraze in so bolj podobne človeku.

Tabela 1: Opice starega in novega sveta.

OPICE NOVEGA SVETA	OPICE STAREGA SVETA
izvirajo iz Afrike in Azije	izvirajo iz centralne in Južni Amerike
tropski deževni pragozd, savana, grmičevje, v gorah omejeni na bolj drevesne habitate	velik razpon različnih habitatov – od deževnega gozda do savane, grmičevja, tudi gorska področja, večina jih večino časa preživi na tleh
<i>Samiri sciureus</i> , <i>Callitrix jacchus</i> idr.	<i>Rhesus macaque</i> , <i>Cercopithecus ethiops</i> , <i>Papio sp.</i> idr.
ploščat nos, nosnice so zelo narazen in so odprte na stran	nos je obrnjen navzdol, nosnice so bližje skupaj, odprte navzdol in naprej (isto pri višjih opicah in človeku)
raje 3 kot 2 predmeljaka, relativno veliki meljaki, zadnji meljak je majhen ali pa manjka	2 predmeljaka, čeljust je specializirana za brušenje zgornjih podočnikov, kočniki imajo ostre ploskve
36 zob	32 zob, dostikrat ustne vrečke
bobničeva membrana je z zunanjim ušesom povezana s kostnim obročkom	bobničeva membrana je z zunanjim ušesom povezana s koščeno cevko, vidna na zunanji strani lobanje
nekateri vrste imajo oprijemalni rep	vse imajo rep, vendar ni oprijemalen
palec leži vzporedno z ostalimi prsti, s kazalcem se prekrivata, kot se prekrivajo škarje	palci so rotirani in bolj pravokotno postavljeni glede na ostale, podobni našim
nekateri vrste imajo nohte samo na velikem palcu	nohti so prisotni na vseh prstih
samec je pogosto vključen v skupnost le malo vrst ima skupnosti: 1 samec, več samic, kot je značilno za opice starega sveta	samec je redko vključen v skupnost ali pa sploh ni (pri večini vrst, izjeme so giboni)
imajo rade sadje, manj listje	nekateri vrste, ki jedo listje, imajo specializirana prebavila, da lahko preživijo z malovredno hrano
imajo žleze za izločanje vonja – se bolj zanašajo na markiranje teritorija kot opice starega sveta	izrazita seksualna koža okrog anusa in vagine pri samicah, ki oteče med estrusnim ciklom
	»sedalne blazinice« (<i>ischial callosities</i>) – otrdela področja, ki se nahajajo okrog regije repa in so pomembne za oporo živali, ko sedi na drevesu ali zemlji, pri hranjenju, počitku in spanju

LITERATURA

1. Jarvis, E. D. in sod. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 151–9.
2. Bolhuis, J. J., Gahr, M. Neural mechanisms of birdsong memory. Nat Rev Neurosci 2006; 7: 347–57.
3. Golob Z. Funkcionalna anatomija ptičev z osnovami ornitologije. 2. dopol. izd. Maribor: Univerza v Mariboru: Fakulteta za naravoslovje in matematiko, 2011.
4. Kardong KV. Vertebrates. Comparative anatomy, function, evolution. 3rd ed. New York: Washington State University, 2002.

UVOD

Poznavanje fizioloških lastnosti in parametrov pri laboratorijskih živalih je pomembno ne samo za ocenjevanje in ovrednotenje izsledkov raziskav, pač pa tudi za zagotovitev namestitve, prehrane, oskrbe mladičev in drugih aktivnosti, ki so potrebne za zadovoljitev dobrega počutja teh živali.

Kot poskusne živali se uporabljajo predvsem različne vrste glodavcev in kunci, čeprav se poskusi opravljajo tudi pri domačih živalih, nekaterih mesojedih živalih in opicah.

KROGHOVO NAČELO

Danski Nobelov nagrajenec za medicino in fiziologijo v letu 1920, Schack August Stenberg Krogh (1874–1949), je postavil načelo za izbiro poskusnih živali za fiziološke raziskave. Glede na to načelo je potrebno za raziskavo določenega fiziološkega procesa izbrati takšno vrsto živali, katere ustroj telesa (velikost živali ali posameznih organov, dostopnost področja za meritve) in delovanje (frekvenca sprožanja impulzov, termoregulacija, hibernacija, bioritmika) sta najprimernejša za poskus, s ciljem pridobiti jasne, ponovljive rezultate. Čeprav je bilo načelo namenjeno fiziološkim poskusom, ga lahko uporabimo širše, za vse vrste raziskav na poskusnih živalih.

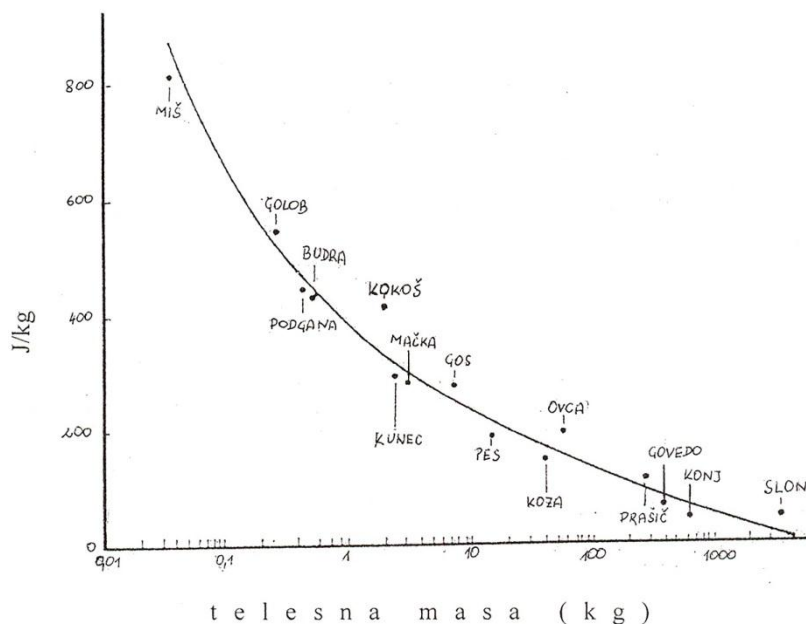
VELIKOST/MASA ŽIVALI IN FIZIOLOŠKI PARAMETRI

Razlike med telesno maso različnih živalskih vrst so ogromne. Najmanjše živali med sesalci so rovkke (*Crocidura sp.*, *Suncus sp.*), ki tehtajo 4–7 g, med kopenskimi živalmi je največja vrsta afriški slon (*Loxodonta africana*), ki tehta 3500–5000 kg. Največje in najtežje živali na Zemlji so sinji kiti (*Balaenoptera musculus*), s telesno maso do 130 ton. Masa sinjega kita odgovarja masi 25–37 slonov ali 130–200 govedi. Štiritoński afriški slon je milijonkrat težji kot 4-gramska rovkka. Telesni masi stotonskega modrega kita odgovarja 25 milijonov 4-gramskih rovk. Med telesnimi masami različnih vrst ptic so razlike sicer velike (npr. kolibri:noj=1:10.000), vendar precej manjše kot med sesalci.

Velikost oziroma masa živali vplivata na različne fiziološke parametre.

Velikost/masa živali in tvorba toplote

Kleber je leta 1932 proučeval tvorbo toplote kot odraz intenzivnosti metabolizma pri živalih različnih velikosti in vrednosti pri različnih živalih prikazal na krivulji. Ker je bila največja žival vol in najmanjša podgana, so krivuljo poimenovali krivulja podgana–vol. Na diagramu, na katerem sta telesna masa in nastala toplota prikazani v logaritemskih vrednostih, dobimo premico z nagibom 0,75. To pomeni, da imajo živali z majhno telesno maso, kamor sodijo tudi t.i. laboratorijske živali, intenzivnejši metabolizem kot velike živali. Razlike v metabolizmu se odražajo v fizioloških vrednostih. Kasneje so drugi raziskovalci (Brody, Proctor, Ashworth, Benedict) prikazali podobne krivulje, ki so jih dopolnili še z večjimi in manjšimi živalmi, ter dobili krivuljo miš–slon.

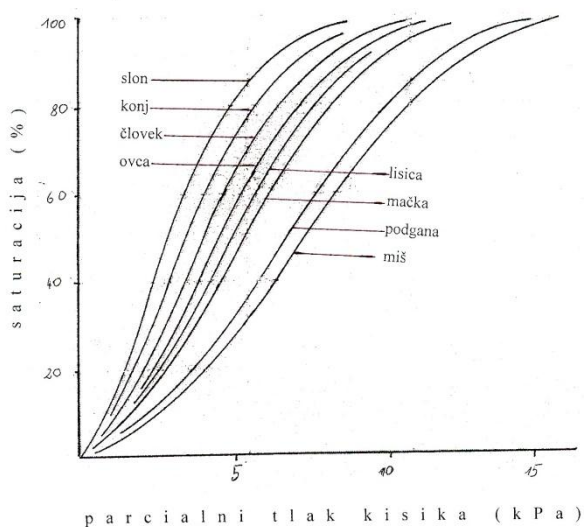


Slika 1: Soodvisnost bazalnega metabolizma in velikosti/mase živali.

Dva primera lahko plastično osvetlita razmerje med velikostjo živali in tvorbo toplote (termogenezo). Če bi bila presnova pri govedu enako intenzivna kot pri miši, bi bila temperatura telesne površine nad vreliščem, miš s termogenezo, enake intenzivnosti kot govedo, pa bi morala imeti kožuh z dlakami, dolgimi okoli 20 cm, da bi obdržala stalno telesno temperaturo.

Velikost/masa živali in disociacijska (saturacijska) krivulja oksihemoglobina

Disociacijska (saturacijska) krivulja oksihemoglobina je pri manjših živalih premaknjena v desno in navzdol (kot pri Bohrovem efektu), kar pomeni, da hemoglobin pri manjših živalih ob istem parcialnem tlaku odpušča več kisika kot pri velikih živalih.



Slika 2: Disociacijske/saturacijske krivulje oksihemoglobina pri nekaterih živalih.

Razmerje med nekaterimi fiziološkimi spremenljivkami in telesno maso pri sesalcih (M_T = telesna masa)

poraba kisika ($L\ h^{-1}$) = $0,676 \cdot M_T^{0,75}$

poraba kisika na enoto telesne mase ($L\ h^{-1}\ kg^{-1}$) = $0,676 \cdot M_T^{-0,25}$

količina predihanega zraka ($L\ h^{-1}$) = $20,0 \cdot M_T^{0,75}$

pljučni volumen (L) = $0,063 \cdot M_T^{1,02}$

dihalni volumen (L) = $0,0062 \cdot M_T^{1,01}$

volumen krvi (L) = $0,055 \cdot M_T^{0,99}$

frekvenca dihanja (min^{-1}) = $53,5 \cdot M_T^{-0,26}$

frekvenca srca (min^{-1}) = $241 \cdot M_T^{-0,25}$

masa srca (kg) = $0,0058 \cdot M_T^{0,99}$

masa ledvic (kg) = $0,021 \cdot M_T^{0,85}$

masa jeter (kg) = $0,082 \cdot M_T^{0,87}$

Sila, moč, delo pri velikih in majhnih živalih

Slon je absolutno močnejši kot miš, vendar lahko slednja bolje obvladuje svoje telo. Premika se izredno hitro, lahko pleza navpično, se premika po stropu ali veji, obrnjena s hrbtom navzdol, preskoči razdalje, ki so veliko večje kot njena dolžina telesa, skoči iz velike višine na tla itd.

Vzrok za navidezno večjo silo, ki naj bi jo razvile mišice majhnih živali, je v enakosti zgradbe mišic in telesni masi. Mišice imajo enako dolge sarkomere, zgrajene iz enakih filamentov. Vse mišice, ne glede na vrsto živali, lahko razvijejo enako silo na enoto prečnega prereza. Ker je miš manjša in lažja, lahko razvije večjo silo za obvladovanje telesa kot npr. slon.

FIZIOLOŠKE LASTNOSTI GLODAVCEV (*Rodentia*) IN NJIHOVA UPORABA V EKSPERIMENTALNE NAMENE

MIŠ (*Mus musculus*)

Laboratorijske miši, ki so jih pričeli ljubiteljsko gojiti predvsem v začetku 20. stoletja, izvirajo iz podvrst *M. m. musculus* in *M. m. domesticus*. Albine miši so poznali že v antiki. Prve študije pri miših so bile opravljene v 17. stoletju, povečano zanimanje za biološke raziskave pa se je razvilo v 19. stoletju.

Od sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja so pričeli gojiti številne seve, izvirajoče iz azijskih miši (*M. m. castaneus*, *M. m. molossinus*, *M. m. spretus*), tako da danes poznamo več kot 1000 različnih sevov, številni med njimi imajo več podlinij. Poleg tega je poznano ogromno število mutirajočih sevov, možne pa so seveda različne kombinacije križancev. Število sevov še narašča z uvajanjem novih gensko manipuliranih živali. Fiziološki parametri se zato pri različnih sevih močno razlikujejo.

Splošne lastnosti

Telesna masa: 20–40 g (♂), 18–40 g (♀). Življenjska doba: 1,5–3 leta.

Uporaba

Različni sevi in linije omogočajo opazovanje določenih bolezni. Sevi s povišanim krvnim tlakom so primerni za proučevanje hipertenzije, sevi s prirojeno sladkorno boleznijo za proučevanje diabetesa ipd.

Prebava

Miši dnevno zaužijejo 15 g hrane in popijejo 15 ml vode na 100 g telesne mase.

Submaksilarna slinavka izloča samo seromukoidno slino. Notranja površina požiralnika in proksimalni del želodca sta keratinizirana, distalni del želodca pa je žlezni. Izločanje želodčnega soka poteka v praznem ali polnem želodcu.

Prebavila naseljuje več kot 100 različnih vrst bakterij, ki v prebavila vstopijo kmalu po rojstvu. V slepem črevesju je do 10^{11} bakterij na gram vsebine. Bakterije v prebavilih so razmeroma zapleten ekosistem, koristen za makroorganizem, saj sintetizirajo nekatere vitamine in povečujejo odpornost proti nekaterim patogenim mikroorganizmom.

Pri gnotobiotičnih miših so proučevali vlogo posameznih bakterij v procesih prebave, tako da so jim po rojstvu inokulirali samo določene bakterije.

Presnova in termoregulacija

Miši imajo razmeroma veliko telesno površino glede na maso. Temperatura termične nevtralnosti je pri miših $29,6\text{--}30,5^{\circ}\text{C}$, kar je veliko ožji razpon kot pri katerikoli drugi vrsti. Območje komfortne temperature je nižje ($21\text{--}25^{\circ}\text{C}$). Pri tej imajo živali več mladičev v gnezdu, večje preživetje in hitrejšo rast. Rektalna temperatura je $38\text{--}39^{\circ}\text{C}$.

Miši telesno temperaturo urejajo brez drgetanja. Miš, aklimatizirana na hladno okolje, lahko proizvaja trikrat večjo količino toplote kot v bazalnem metabolizmu. To je edinstvena lastnost, ki pri drugih živalskih vrstah ni poznana. Pri znižanju zunanje temperature morajo miši za vsako stopinjo izpod termične nevtralnosti proizvesti 46 cal/m^2 telesne površine v 24 urah, kar pomeni veliko obremenitev za telesno presnovo. Miši zato težje prenašajo morebitne nočne ohladike kot večje živali, zato odklapanje gretja ponoči ni priporočljivo.

Presnova vode je pri miših posebno hitra zaradi velike telesne površine, preko katere izpareva. Biološka razpolovna doba za vodo je 1,1 dneva. Živali vzdržujejo stalno vsebnost vode s koncentriranim urinom in hlajenjem izdihanega zraka.

Miši nimajo znojnic, ne razvijejo pohitrenega dihanja, se ne slinijo. Kompenzirajo lahko spremembe zunanje temperature od 25 do 35°C . To dosežejo z zniževanjem bazalnega metabolizma, povečanjem telesne temperature in povečanim pretokom krvi v ušesne vene. V naravi se ob povečani temperaturi umaknejo v rove, v umetnih pogojih se ne morejo, zato pri zunanji temperaturi 37°C pričnejo poginjati. Miši niso pravi endotermi, mladiči so do starosti 20 dni ektotermični.

Miš v mirovanju v eni uri porabi okoli $3,5\text{ mg O}_2$ na gram telesne mase, kar je približno 22-krat več kot slon. Koncentracija glukoze je razmeroma velika zaradi intenzivnega metabolizma.

Dihanje

Zaradi intenzivnega metabolizma in velike porabe kisika imajo miši velik alveolarni parcialni/delni tlak (pO_2), hitro dihanje (frekvenca $163/\text{min}$, razpon $60\text{--}220$), dihalni volumen ($0,18\text{ ml}$, razpon $0,09\text{--}0,38\text{ ml}$), večje število eritrocitov in višjo koncentracijo hemoglobina ter večjo aktivnost karboksianhidraze. Premik disociacijske/saturacijske krivulje oksihemoglobina omogoča, da se kisik odceplja pri večjem parcialnem tlaku. Delni ali parcialni tlak ogljikovega dioksida (pCO_2) arterijske krvi je $40 \pm 5,4\text{ mm Hg}$, pH arterijske krvi pa $7,2\text{--}7,4$.

Krvni obtok

Srčna frekvenca je $310\text{--}840$ utripov/min. Sistolični arterijski krvni tlak je $133\text{--}160\text{ mm Hg}$, diastolični pa $102\text{--}110\text{ mm Hg}$. Iztisni volumen srca je $1,3\text{--}2\text{ ml}$, minutni pa 24 ($11\text{--}36$) ml/min .

Največja dovoljena količina odvzema krvi je 5 ml/kg .

Čas koagulacije je $2\text{--}10\text{ min}$, protrombinski čas pa $7\text{--}19$ sekund.

Ekskrecija

Miši imajo okoli 4,8-krat več glomerulov, njihova filtrirna površina je približno 2-krat tolikšna kot pri podganah. V 16 urah izločijo $1,6 \pm 0,9$ ml močno koncentriranega urina. Velika koncentracija je omogočena z dolgimi Henleyjevimi zankami in velikimi povezavami *v. recta*. Ozmolarnost mišjega urina je lahko do 4300, človeškega le 1160 mOsm/l. pH urina je 5,011.

V urinu se v fizioloških pogojih izloča glukoza v količini $0,53 \pm 0,16$ mg v 24 urah in razmeroma velike količine beljakovin ($0,7 \pm 0,33$ mg v 24 urah). Albumini se v urinu nahajajo v koncentraciji $11,9 \pm 0,2$ mg/ml. Izloča se tudi aminokislina taurin, triptofan pa ne. Z urinom se vedno izloča tudi kreatinin ($2,6 \pm 0,91$ mg/100g v 24 urah), zaradi česar se miši ločijo od drugih sesalcev. Razmerje med kreatininom in kreatinom pri stradajoči miši je 1:1,4. Miši izločijo več alantoina kot sečne kisline.

Ob posameznem uriniranju iztisnejo miši le kapljico ali dve urina.

Endokrini sistem

Miši ne izločajo kortizola, pač pa kortikosteron.

PODGANA (*Rattus norvegicus*)

Rod *Rattus* vsebuje okoli 130 vrst. Najbolj razširjeni in poznani sta vrsti *R. rattus* ali črna podgana in *R. norvegicus* ali siva podgana. Obe vrsti domnevno izvirata iz Azije. Črna podgana je prišla v Evropo v 12., v Ameriko pa v 16. stoletju. Siva podgana je prišla v Evropo v 18. stoletju, v naslednjem pa se je razširila po zahodni polobli. Verjetno zaradi večje velikosti in agresivnosti je siva podgana v veliki meri izrinila črno.

Udomačitev albino podgan se je v Evropi in Ameriki pričela v začetku 19. stoletja, kjer so te živali začeli gojiti kot plen, pri igrah, v katerih so med trop podgan spustili psa, navadno terierja. Zmagal je pes, ki je v čim krajšem času pobil čim več podgan. Zaradi velikih potreb po teh živalih so gojili tudi divje podgane, albino primerke pa so pričeli gojiti ljubitelji. Prvi poskus na podganah je v letu 1865 opravil M. J. Philipeaux ob proučevanju adrenalektomije. Leta 1890 je H. H. Donaldson na Inštitutu Wistar uvedel nadzorovano rejo podgan.

Splošni podatki

Telesna masa: 300–500 g (♂), 250–300 g (♀). Življenjska doba: 2,5–3 leta.

Uporaba

Podgane so poleg miši drugi najpogostejše uporabljeni sesalec v biomedicinskih raziskavah in v raziskavah, vezanih na proučevanje obnašanja. Prednosti za uporabo so razmeroma kratka brejost in kratka življenjska doba, umirjeno obnašanje pa tudi lastnosti posameznih sevov s poznanim genetskim izvorom. Podgane se največ uporabljajo v toksikoloških, teratoloških in rakotvornih testiranjih. Kot v preteklosti se tudi danes nadaljujejo vedenjske, nevrološke, prehranske in endokrinološke raziskave. Podgane so zaradi primerne velikosti uporabne tudi v kirurških raziskavah, od presajanja organov do uvajanja različnih vaskularnih tehnik.

Prebava

Podgane dnevno zaužijejo 10 g hrane in popijejo 8–11 ml vode na 100 g telesne mase. Želodec je razdeljen na prednji ali kardialni del, ki je brez žlez, in na žlezni, pilorusni del. Oba predelka loči greben, ki je po nekaterih razlagah tudi vzrok, da podgane ne bruhamo.

Krvni obtok

Srčna frekvenca je 250–450 utripov v minuti. Oskrba s krvjo atrijev je izven koronarnega obtoka, izvira pa iz mamarne arterije in arterie subclaviae. Arterijski sistolični tlak je 116, diastolični pa 90 mmHg. Minutni volumen srca je 50 ml/min.

Dihanje

Pulmonalna vena ima progasta mišična vlakna, podobna tistim v srcu. Ni adrenergičnega oživčenja bronhialne mišičnine. Dihalni volumen je 1,5 ml, frekvenca dihanja pa 70–115/min. Alveolarna površina pri 400 g težki živali je 7,5 m².

Presnova in termoregulacija

Rjavo maščobno tkivo je v ventralnih in lateralnih področjih vratu. Rektalna temperatura je 36–40°C. Telesno temperaturo uravnavajo s pospešenimi oksidacijskimi procesi, ker nimajo razvitega sistema za drgetanje mišic. Bazalni metabolizem (pri 400 g težki živali) je 235 kcal/dan.

Ekskrecija

Ledvice podgan so, ker imajo površinske nefrone, ki omogočajo mikropunkcijo in s tem proučevanje transporta tekočine v nefronu, primeren model za proučevanje fiziologije ekskrecije.

Dnevna količina urina je približno 5,5 ml/100 g telesne mase, dnevna količina izločenih Na⁺ 1,63 mmol/100 g telesne mase, K⁺ pa 0,83 mol/100 g telesne mase. Ozmolarnost urina je 1659 Osm/kg H₂O, pH urina pa 7,3–8,5.

Čutila

Očesni zrkli sta izbočeni (eksoftalmus), kar sicer omogoča boljše panoramsko gledanje, vendar zaradi tega obstaja nevarnost poškodbe roženice, predvsem pri splošni anesteziji. Harderianove žleze, nameščene medialno ob orbiti, izločajo porfirin, katerega izločanje se močno poveča (kromodakriorea), kadar je žival v stresu, kot npr. pri podhranjenosti, dehidraciji, v bolezni, pri neugodnih dejavnikih okolice ipd. Perorbitalno in okoli nosnic se pojavi rdečkast izcedek ali krasta. Orbitalni venski sinus omogoča odvzem krvi.

Dolgo časa je veljalo, da podgane ne vidijo barv, poskusi iz leta 1999 nakazujejo vsaj bikromatično gledanje.

Voh je dobro razvit, z njim samci zaznavajo druge samce, samice v estrusu ali alarmne feromone drugih podgan. Zaznavanje zvoka sega pri 70 dB od 250 Hz do 70–80 kHz, 8–32 kHz je najbolj senzitivno območje.

Endokrini sistem

Tudi pri podganah je glavni glukokortikoid kortikosteron.

MORSKI PRAŠIČEK ALI BUDRA (*Cavia porcellus*)

Peruanskega morskega prašička so udomačili že andski Indijanci in ga uporabljali za hrano ter kot žrtevno žival. Nizozemci so v 16. stoletju uvozili živali v Evropo. Najprej so jih gojili ljubiteljsko, potem tudi v poskusne namene.

Splošni podatki

Telesna masa: 900–1000 g (♂), 700–900 g (♀). Življenjska doba: 3–4 leta, izjemoma 6–7 let.

Uporabnost

Morski prašički so uporabni za proučevanje anafilaksije, astmatičnih obolenj, pozne preobčutljivosti, nekaterih kužnih bolezni, v imunoloških, genetskih, gnotobiotičnih, prehrabnih, otoloških in farmakoloških raziskavah.

Prebava

Živali so rastlinojedi, izraziti črevesni fermentatorji. Cekofagija je pomembna, debele ali breje samice jedo feces tudi s tal. Mladiči jedo feces mater in se s tem infestirajo. V naravi se prehranjujejo ob jutranjem in večernem somraku. V laboratorijih z 12-urno svetlobo in 12-urno temo se hranijo podnevi in ponoči s presledki med hranjenji. Dnevno pojedjo 6 g hrane in popijejo 10 ml vode na 100 g telesne mase. Mladiči kmalu po rojstvu jedo enako hrano kot odrasle živali.

Želodec je nedeljen in v celoti pokrit z žleznim endotelijem. Praznjenje traja okoli 2 uri. Cekum je velik in vsebuje do 65 odstotkov celotnega volumna. Praznjenje slepega črevesa je počasno. Glavna maščobna kislina, ki nastaja pri prebavi ogljikovih hidratov, je propionska kislina. Čas prehoda vsebine skozi prebavila je okoli 20 ur (13–30), upošteva se koprofagijo celo 60–70 ur.

Presnova

Ker budre, tako kot ljudje in antropoidne opice, ne morejo sintetizirati vitamina C, ga morajo pridobiti s hrano.

Rektalna temperatura je 37,2–40 °C, temperatura toplotne nevtralnosti pa 2–31 °C. Poraba kisika je 0,76–0,83 ml/g telesne teže v uri.

Dihanje

Dihalni volumen je 2,3–5,3 ml/kg telesne teže, frekvenca dihanja pa 42–104/min. pCO₂ arterijske krvi je 21–59 mm Hg, pH arterijske krvi pa 7,17–7,53.

Krvni obtok

Srčna frekvenca je 230–380. Minutni volumen je 240–300 ml/min. na kg telesne mase, arterijski sistolični krvni tlak 80–94, diastolični pa 55–58 mm Hg.

Endokrini sistem

Rastni hormon ne vpliva na rast živali, ker sta inzulinu podobna rastna faktorja (Insulin Like Growth Factor) IGF-I in IGF-II odgovorna za rast, ne nastajata pa pod vplivom ravnega hormona. Urejanje njunega izločanja ni jasno.

Krvna slika

Prevladujoči levkociti so limfociti. Nevrofilci imajo razločna eozinofilna zrnca. Posebnost so Foa - Kurlloffove celice. To so mononuklearni levkociti, katerih število je odvisno od koncentracije estradiola v krvi. V obtoku se pojavijo predvsem v času brejosti. V citoplazmi se nahaja mukopolisaharidno, proteoglikansko telesce, ki vsebuje hidrolitične encime, podobno kot v celicah ubijalkah. Imajo citotoksično aktivnost *in vitro*. Celice se, poleg v obtoku, nahajajo predvsem v timusu, vranici, jetrih, pljučih in placenti. V tej imajo verjetno vlogo pri preprečevanju zavračanja fetalne placenti.

HRČKI (*Cricetidae*)

Hrčki so zelo obsežna družina glodavcev, v kateri je poznanih okoli 500 vrst. Največ vrst je v Severni in Južni Ameriki, kjer predstavljajo tisto, kar so v Evropi miši.

Zlati ali sirski hrček (*Mesocricetus auratus*)

Skoraj vsi zlati hrčki izvirajo iz gnezda, ki je bilo zajeto leta 1930 v Siriji, od katerega sta v ujetništvu ostali dve samici in samec. Naravno življenjsko območje živali obsega poleg Bližnjega vzhoda tudi področje vzhodne Romunije, Bolgarije in Kavkaza. Živi v stepskih, ilovnatih področjih, kamor koplje obsežne rove, kjer ima ležišča in shrambe hrane. Občasno spi zimsko spanje.

Vzroki za obširno uporabo v poskusih so uspešna reprodukcija, hitra rast in razvoj z razmeroma kratko življenjsko dobo in precejšnja naravna odpornost na bolezni. V enem letu lahko ima samica 6 ali celo več legel s 4–12 mladiči.

Splošne lastnosti

Telesna masa: 85–140 g (♂) oz. 95–120 g (♀). Odrasle samice so pogosto težje kot samci. Življenjska doba: 2–3 leta.

Uporaba

Prve raziskave so bilo opravljene v zvezi s proučevanjem lišmanioze. Uporabljivi so v proučevanju tumorjev virusnega izvora, glivičnih okužb, histoplazmoze, mikobakterijskih okužb (tudi tuberkuloze in lepre), mikoplazmoze, leptospiroze, različnih virusnih in protozojskih okužb, helmintskih invazij in prionskih bolezni. V prebavilih so razmeroma pogoste neoplazme, pogosto tudi rak trebušne slinavke in jetrnih izvodil. Dajanje estrogenov samcem povzroči pri njih renalne tumorje. V pljučih se lahko razvijejo spremembe, podobne pljučnemu emfizemu pri ljudeh. Zaradi sposobnosti razgradnje nikotina so primerni za študij vpliva kajenja na organizem.

Zaradi prirojenih bolezni se nekatere linije uporabljajo za ciljane raziskave. Pri sevu BIO 1.50 je bila že leta 1962 opisana mišična distrofija, kardiomiopatije so poznane pri sevih BIO 14.4, BIO 82.62, BIO–TO–2, BIO 53.58. Sev BIO 4.24 je značilen zaradi debelosti pri samicah, z endokrinimi anomalijami in veliko pojavnostjo benignih adenomov v skorji nadledvične žleze. Za sev UMX je značilna recesivna avtosomalna mišična distrofija. Linija BIO 15.16 se uporablja pri poskusih s kajenjem. Nekatere linije, kot npr. BIO RB in CLAC, so uporabne kot kontrolne živali.

Fiziološke posebnosti

V ustni votlini se nahajajo lični mešički, v katerih živali zbirajo hrano in steljo ter jo prinašajo v gnezdo. V stenah teh mešičkov ni žlez, pač pa veliko mastocitov. Vreče je lahko izvihnati, zato se uporabljajo za proučevanje mikrovaskularnih procesov pri vnetjih, tumorskih in imunskih procesov.

V naravi se zlati hrček hrani pretežno z rastlinsko hrano, pa tudi z žuželkami ali mesom majhnih živali. Dnevna količina v ujetništvu zaužite hrane je okoli 15 g, popite vode pa približno 10 ml na 100 g telesne mase.

Želodec je razdeljen na predželodec in žlezni želodec, med katera vstopa požiralnik. V predželodcu potekajo pomembni encimski procesi na osnovi encimov iz mikroorganizmov.

Srčna frekvenca je 250–500 utripov v minuti, frekvenca dihanja pa 35–135/min.

Rektalna temperatura je 37–38 °C. Hibernacija je odvisna od linije in tudi od posameznih živali. Pri znižani zunanji temperaturi pričnejo živali zbirati hrano, pri temperaturi 5 ± 2 °C pa večinoma padejo v

zimsko spanje. Pred zimskim spanjem si ne naberejo maščobnih zalog, pač pa se občasno zbudijo in nahranijo. Živali v hibernaciji ostanejo občutljive na zunanje dražljaje in se zbudijo ob dotikanju.

Sirski in kitajski hrček sta najbolj odporna na sevanje glede na smrtnost in čas preživetja po obsevanju.

Harderianove žleze izločajo izloček, bogat z lipidom in porfirinom. Samice izločijo 100- do 1000-krat več porfirina kot samci. Tovrstni spolni dimorfizem, vezan na izločanje androgenov, pri drugih vrstah hrčkov ni poznan.

V oocite penetrirajo človeški spermiji.

Na bokih se nahajata bočni žlezi, ki pri samcih izločata pod vplivom androgenov. Izloček služi za teritorialno označevanje. Samice imajo tudi dorzalno žlezo, ki je pod vplivom spolnega ciklusa.

Kitajski hrček (*Cricetulus griseus*)

Kitajski hrček je manjši kot sirski, povprečna telesna masa je 39,3–45,7 g. Življenjska doba je podobna kot pri sirskem in znaša 2,5–3 leta. Količina dnevno popite vode je 11,4 ml za samce in 12,9 ml/100 g telesne mase pri samicah. Po parjenju so samice izredno agresivne in lahko ubijejo samce. Opisan je spontani prirojeni diabetes mellitus. Zaradi odpornosti na sevanje živali uporabljajo v tovrstnih raziskavah.

Armenski hrček ali hrčiček (*Cricetulus migratorius*)

Armenski hrček ali hrčiček živi v Evropi, na jugovzhodnih obalah Grčije in severovzhodnih obalah Črnega morja. Življenjsko območje so zarasla stepska pobočja, pa tudi polja in vrtovi. Pod zemljo koplje rove, kjer ima gnezda in shrambe hrane. Pozimi ne spi. Telesna masa je lahko podobna kot pri kitajskem hrčku, lahko pa je občutno večja in doseže 40–80 g.

Evropski hrček (*Cricetus cricetus*)

Evropski hrček je največji, telesna masa je 300–400 g in je približno 3-krat večja kot pri sirskem. Običajna življenjska doba je 2,5–3 leta, lahko pa tudi 6–10 let. V naravi se hrani z žitom, zelenimi rastlinami in manjšimi živalmi.

V naravi evropski hrčki živijo v stepah in na poljih, kjer kopljejo dolge podzemne rove. Zimski rovi, v katerih so tudi zaloge hrane, so obsežnejši kot poletni. Živijo samotarsko, do drugih živali in do živali iste vrste so agresivni. V laboratorijskih rejah, kjer živali v glavnem ne prespijo zime, so samci in samice zelo agresivni drug do drugega, postanejo pa manj agresivni do ljudi. V gnezdu se vzpostavi hierarhija, v kateri je dominanten največji samček. Aktivni so predvsem ponoči, močno je izražen dnevno-nočni ritem. V naravi zimo prespijo, pri prebujanju se samci prebudijo pred samicami. Hranijo se s semeni, zelenimi rastlinami, gomolji, koreninami in plodovi, pa tudi z žuželkami, polži, deževniki in manjšimi vretenčarji.

Uporabnost

Evropski hrček se uporablja za proučevanje hibernacije ter v stomatoloških in onkoloških raziskavah.

Ruski (*Phodopus campbelli*) in sibirski (*P. sungorus*) hrček

Ruski in sibirski hrček sta bila do nedavnega opisana kot podvrsti džungarijskega hrčka. Ruski hrček prebiva v naravi na Kitajskem, v Mongoliji in Sibiriji, sibirski pa v Kazahstanu, Mandžuriji in severni Kitajski. Obe vrsti sodita med pritlikave hrčke, saj je njuna telesna masa samo 18–25 g. Življenjska doba je 9–15 mesecev, posamezni osebki lahko živijo do 2 let. So izrazito fotoperiodični, kritično obdobje fotoperiode je približno 13 ur (pri sirskem hrčku 12,5, pri evropskem pa 15,5 ure). Kljub nizkim zunanjim temperaturam (do –40 °C) ne hibernirajo. V hladnejših obdobjih se pojavijo povečana

masa srca, večje površine eritrocitov, spremenjena koncentracija hemoglobina, kar vse privede do boljše oskrbe s kisikom. V hladnem okolju se zniža metabolizem in poveča sposobnost termogeneze brez drgetanja.

Uporabnost

Živali so uporabne za proučevanje obnašanja, dnevno-nočnih ritmov, vezanih na izločanje melatonina in delovanje pinealne žleze ali epifize. Ker se parijo že na dan skotitve mladičev, so zanimive tudi za raziskave v zvezi z reprodukcijo. Zaradi razmeroma velike pojavnosti novotvorb se uporabljajo tudi v onkoloških raziskavah.

Belorepa podgana (*Mystromys albicaudatus*)

Čeprav ime ne kaže, sodijo 75–185 g težke, rastlinojede in ponoči aktivne živali v družino hrčkov. Izhajajo iz južne Afrike, kjer živijo v rovih, ki jih izkopljejo druge živali. Imajo dvodelen želodec, na trebuhu veliko lojnico. Samice imajo dva para ingvinalnih mlečnih žlez in rudimentarni ostanek prostate. Samci imajo os penis.

V raziskavah jih uporabljajo pri proučevanju diabetesa mellitusa, ker se pri njih pojavljajo degenerativne spremembe Langerhansovih otočkov, hiperglikemija, poliurija, glikozurija in ketonurija. Uporabne so tudi pri proučevanju lišmanioze in v nekaterih mikrobioloških ter onkoloških raziskavah. Pri teh živalih so preučevali tudi termoregulacijo in prebavo.

DRUGI GLODAVCI

Zlasti v ZDA uporabljajo za proučevanje hibernacije, hepatitisa B, jetrnega karcinoma in nastanka žolčnih kamnov **zemeljske veverice** (*Spermophilus* sp.), med njimi predvsem vrste *S. richardsonii*, *S. armatus*, *S. tridecemlineatus*, *S. lateralis* in *S. beecheyi*. Ti 85–100 g teški glodavci so v naravi razširjeni skoraj v vseh habitatih, razen v močno zaraščenih gozdovih. V zemljo kopljejo rove v več nadstropjih. Vse vrste so aktivne podnevi, z obdobji aktivnosti takoj po sončnem vzhodu, od 10.00 do 14.00 h in od 16.00 h do sončnega zahoda. Zimsko spanje traja od septembra ali oktobra do aprila ali maja, torej 7 mesecev. V naravi se hranijo s semeni, oreški, koreninami, gomolji, gobami, zelenimi rastlinami, žuželkami in drugimi nevretenčarji, pa tudi s ptičjimi jajci. V umetni reji lahko jedo hrano za podgane. V laboratorijih je primerna temperatura okolja 18–22 °C, hibernacija nastopi v zatemnjenem prostoru pri temperaturi 5–10 °C.

Prerijski pes (*Cynomys ludovicianus*) je 0,7 do 1,4 kg težek glodavec, ki živi v družinskih skupnostih v rovih, izkopanih v zemljo. So dnevno aktivne živali, niso popolni hibernatorji. Zaznavajo izredno nizke frekvence zvoka, okoli 4 Hz, slabše pa srednje in višje tone. To območje sluha je verjetno povezano z njihovim podzemljskim načinom življenja. V raziskavah so uporabni za proučevanje holelitiaze in diareje, povezane z uporabo antibiotikov.

V družino **podgan mošnjičark ali gofrov** (*Geomyidae*) sodita dva rodova (*Geomys* in *Thomomys*) in skupaj 17 vrst. V naravi so živali samotarske, razen v času parjenja. Kopljejo dve vrsti rogov. V ene shranjujejo hrano, v drugih živijo, redijo mladiče in odlagajo iztrebke. Ne hibernirajo, čeprav so pozimi neaktivne. Ime imajo po mošnjičkih v ustni votlini, kamor lahko shranjujejo hrano. Živali so uporaben model za proučevanje molekularne evolucije.

Kengurujske podgane (*Dipodomys* sp.) so uvrščene v družino *Heteromyidae*, kamor sodi 6 rodov in 60 vrst. Rod *Dipodomys* obsega 21 vrst, živečih v Severni Ameriki. Kot poskusne živali sta poznani vrsti *Dipodomys spectabilis* in *D. merriami*. Telesna masa je 35–180 g, gibljejo se s skakanjem, zaradi česar imajo tudi ime. Dolg rep, s čopom dlak na koncu, služi za ravnotežje in opiranje. V ustih imajo mešičke za shranjevanje hrane.

V naravi živijo v suhih (aridnih) in polsuhih (semiaridnih) področjih, kjer kopljejo rove. So nočne živali, najbolj aktivne 2–3 ure po sončnem vzhodu in 2 uri pred vzhodom. Sporazumevajo se z

udarjanjem z nogami ob tla. Zaradi sušnega habitata izredno skrbno gospodarijo z vodo – z načinom obnašanja in sposobnostjo koncentracije urina. Če pijejo vodo *ad libitum*, se pri njih razvije stanje, podobno diabetesu insipidusu. V poskusih se uporabljajo za proučevanje fiziologije ledvic in dekompresijske bolezni.

V rod **gozdnih podgan** (*Neotoma sp.*) je uvrščenih 19 vrst, živečih v Srednji Ameriki. Telesna masa je 250–400 g. Živali rade zbirajo svetleče predmete. V poskusih se uporabljajo pri proučevanju obnašanja in pri nevroloških raziskavah.

V rod **kobilčjih miši** (*Onychomys sp.*) so uvrščene tri vrste. 30–60 g težke živali so roparice in se hranijo s kobilicami, hrošči ali drugimi žuželkami. V raziskave so vključene predvsem zaradi izredno agresivnega obnašanja, proučujejo tudi vpliv zdravil na agresivnost. Prav tako so živali model za proučevanje vpliva melatonina na fotoperiodično obnašanje. Uporabne so tudi pri proučevanju lymške bolezni, sprožanja rakastih bolezni in populacijske dinamike.

Belonoge miši (*Peromyscus sp.*) so 19–22 g težke živali, uporabne za proučevanja procesov staranja, nastanka katarakte, obnašanja, genetičnih zakonitosti, občutljivosti na različne zoonoze.

Riževe podgane (*Oryzomys sp.*) so 40–80 g težke živali, zaradi nagnjenosti k spontani periodontalni bolezni uporabne v stomatoloških raziskavah. Raziskave so opravljene tudi v zvezi z delovanjem česarike in melatonina na dnevno-nočni ritem.

Trstične miši (*Zygodontomys sp.*) so težke okoli 100 g, uporabne v genetičnih raziskavah in v proučevanju dnevno-nočnih ritmov.

Gerbili (*Meriones sp.*) sodijo v družino muridov, kamor so uvrščene tudi miši in podgane. Samice tehtajo 50–55, samci pa okoli 60 g. Kopljejo enostavne, plitve rove. Na trebuhu se nahaja velika žleza za označevanje teritorija, katere izločanje je pod vplivom androgenov. Nadledvična žleza je v primerjavi s telesno maso pri podgani skoraj trikrat večja kot pri teh živalih. Skorja izloča enake količine kortikosterona in 19-hidroksikortikosterona. Izločajo malo urina, iztrebki so trdi. Živali so zelo občutljive na cerebralni infarkt, ki nastane s podvezanjem *a. carotis communis*. Prav tako jih uporabljajo pri proučevanju epilepsije in v raziskavah v zvezi z motnjami sluha. Opravljene so tudi raziskave o obnašanju, predvsem v zvezi z obrambo teritorija na osnovi vonjalnih zaznav. Živali so uporabne tudi v parazitoloških raziskavah.

Tudi **voluharji** (*Microtus sp.*) so lahko poskusne živali predvsem pri proučevanju prebave in presnove beljakovin, prisotnosti nekaterih toksinov, epilepsije, delovanja vomeronazalnega organa in njegovega vpliva na dvorjenje, teritorialnega obnašanja, agresivnosti in reprodukcije. Raziskave so bile opravljene v zvezi z vplivom oksitocina in vazopresina na reproduktivno obnašanje. Prav tako so proučevali diabetes mellitus in vpliv holesterola na arterije.

Svizci (*Marmota sp.*) so bližnji sorodniki veveric, težki od 2,5 do 3 kg. Pri svizcih so veliko proučevali zimsko spanje in dnevno-nočni ritem, jemanje hrane, debelost in porabo energije. Uporabni so tudi za proučevanje hepatitisa B.

Večvimenske podgane (*Mastomys sp.*) imajo tudi za glodavce razmeroma veliko število seskov, saj jih lahko imajo celo do 18 parov. Živali tehtajo 20–80 g, živijo do 3 leta. Izvirajo iz podsaharske Afrike, naselile pa so tudi okolico človekovih bivališč. Podčeljustnična slinavka izloča veliko živčnega rastnega faktorja (angl. Nerve Growth Factor), zaradi česar so živali pogosto uporabljene v poskusih proučevanja te snovi. Za raziskovanje so živali zanimive tudi zato, ker imajo samci in samice razvito prostato. Tudi močno razvite mlečne žleze so pri teh živalih objekt proučevanja. Živali so uporabne tudi pri proučevanju različnih bakterijskih, virusnih in zajedavskih bolezni ter nekaterih rakastih obolenj.

Deguji (*Octodon sp.*) živijo v naravi v majhnih kolonijah s čvrsto socialno organizacijo. Naseljujejo Ande do nadmorske višine okoli 1200 m. So dnevno aktivne živali, zadržujejo se v skalnih razpokah in

rovih. Težki so 170–300 g. Uporabljali so jih za proučevanje spanja in budnosti ter drugih cirkadianih aktivnosti, za prilagajanje prehranjevanja v različnih letnih časih glede na razpoložljive vire hrane in za nevrobiološke raziskave razvoja centralnega živčevja, toleranco na zdravila, razvoj diabetesa in nastanek katarakte.

Činčile (*Chinchilla sp.*) izvirajo iz Andov, kjer živijo v skalnih razpokah na višini 3000–5000 m. So rastlinojede živali, aktivne vse leto, živijo v kolonijah, obsegajočih nekaj sto živali. Življenjska doba je 12–20 let. Lahko prenašajo hlad, občutljive pa so na toploto. Kot poskusne živali so uporabljive za proučevanje sluha, vključno s proučevanjem vnetij srednjega ušesa, ateroskleroze, bolezni chagas, endokrinoloških raziskav prebave, termoregulacije, cerebralnega pretoka, obnašanja in reprodukcije.

FIZIOLOŠKE LASTNOSTI KUNCEV (*Oryctolagus cuniculus*)

Telesna masa 1 (pritlikave pasme) do 7 kg (orjaške pasme). Novozelandski beli kunec, iz katerega izhaja večina fizioloških parametrov, sodi med srednje velike pasme (4,5–5 kg). Življenjska doba: 5–7 let.

Uporaba

Kunci so se veliko uporabljali za tvorbo poliklonalnih protiteles. Uporabni so tudi za proučevanje kužnih in rakastih obolenj, podobnih tistim pri ljudeh, kardiovaskularnih boleznih, presnove holesterola (uvadeni posebni sevi) itd.

Prebava

Živali dnevno pojedjo 5 g hrane in popijejo 10 ml vode na 100 g telesne mase. Požiralnik je v celoti iz progaste mišičnine. V njem ni mukoznih žlez. Želodec predstavlja okoli 15 odstotkov volumna prebavil, redko je popolnoma prazen. Običajno je v njem veliko dlak, ki jih živali požrejo ob rednem čiščenju krzna in cekotrofe. Proizvodnja žolča je glede na ostale vrste razmeroma velika. Tanko črevo je v primerjavi z drugimi vrstami relativno kratko, predstavlja okoli 12 odstotkov celotne dolžine prebavil. Resorpcija velikih molekul v črevesju je na splošno slaba, zato kolostrum ne vsebuje imunoglobulinov, saj se ti ne bi resorbirali. Imunoglobulini, ki omogočijo zaščito živali pred zgodnjo infekcijo, preidejo v krvi skozi placento že v embrionalnem obdobju.

Cekum ima približno 10-krat večji volumen kot želodec. V njem nastajajo cekotrofe (nočno blato), ki jih kunci pojedjo neposredno iz anusa. Pri divjih kuncih je cirkadiadna proizvodnja cekotrof obratna, nastajajo predvsem podnevi, ko so živali skrite v rovih. S poširanjem cekotrof kunci (in drugi glodavci, pri katerih nastajajo) bolje izkoristijo vitamine in aminokisline, ki nastajajo pri prebavi v slepem črevesju.

Prehod hrane skozi prebavila traja 4–5 ur.

Dihanje

Nosnice so močno oživčene, med dihanjem trzajo.

Dihanje je predvsem diafragmatsko. Pljučni volumen se večja s starostjo, za razliko od ljudi in psov, kjer se s starostjo manjša. Dihalna frekvenca je 30–60. Totalna pljučna kapaciteta: $111 \pm 14,4$ ml. Dihalni volumen je 4–6 ml/kg telesne mase, minutni volumen pa 0,6 l/min.

Krvni obtok

Trikuspidalna zaklopka ima samo dve plahčici. Aortni živec ne zazna vzdraženja kemoreceptorjev, pač pa le baroreceptorjev. Aorta ritmično utripa zaradi nevrogene stimulacije, sinhrono s pulznim valom. Srčna frekvenca je 130–325, arterijski sistolični tlak je 90–130, diastolični pa 80–90 mmHg.

Izločanje

Število glomerulov narašča po rojstvu, obstajajo tudi ektopični glomeruli. Kreatininski klirens je enak inulinskemu (česar ni pri primatih, podganah, budrah), zato merjenje kreatininskega klirensa omogoči tudi podatek o glomerularni filtraciji. Barva urina je motna zaradi amonijevega-magnezijevega fosfata ter kalcijevega karbonata. Višek kalcija se izloča z urinom. Mladi, zdravi kunci lahko imajo albuminurijo. pH urina je okoli 8,2. Dnevna tvorba urina je približno 50–75 ml/kg telesne mase.

Metabolizem in termoregulacija

Novorojeni kunci so ektotermni do približno 7. dneva. Glukozne rezerve se iztrošijo po 6 urah po rojstvu. Živali postanejo hipoglikemične in ketonične.

Vsebnost vode je okoli 58 odstotkov telesne mase, njen biološki razpolovni čas je 3,9 dneva. Dnevna izguba vode je okoli 340 ml. Po 3 dneh popolnega pomanjkanja vode se jemanje hrane zmanjša na manj kot 2 odstotka. Telesna temperatura je 38,5–40 °C. Uhlji so pomemben organ za termoregulacijo, preko katerih poteka izmenjava toplote z okolico.

NEKATERI FIZIOLOŠKI PARAMETRI PRI LABORATORIJSKIH ŽIVALIH

Preglednica 1: Hematološke vrednosti.

Parameter	Kunec	Miš	Budra	Podgana	Zlati hrček	Kitajski hrček	Evropski hrček
krvni volumen [ml/kg]	55–65	58,5	69–75	60	78		
hemoglobin [g/100 ml]	9,8–14,08	12,2–16,2	11,8–15	13,5–16,65	16,8	12,4	17,3–18,7
hematokrit [%]	34–43	42–44	37,8–48,2	36–50			47,6–50,8
št. eritrocitov [n . 10 ¹² /L]	5,3–6,8	8,7–10,5	5,4	5,05–8,61	7,5	7,12	7,33–8,06
% retikulocitov	1,9–3,8						
MCV [fl]	60–69		81	50–89		53,6–65,2	
MCH [fl]	20–23		25				
MCHC%	31–35		30	33–40		29,49	
sedimentacija [mm/h]	0,92–3				1,64		
št. levkocitov [n . 10 ⁹ /L]	5,1–9,7	5,1–11,6	9,9	5,24–15,2	7,62	5,5	4,8–10,5
% nevtrofilcev	25–46	6,7–37,2	28–44	9–52	29,9	16,9–21,3	20,7–51,6
% limfocitov	39–68	63–75	39–72	52–91,6	73,5	75,2	42,4–77,6
% eozinofilcev	0,1–0,2	0,9–3,8	1–5	0–<2	1,1	1,66–1,74	0,07–1,96
% bazofilcev	2–5	0–1,5	0–3	0–<3	1,1	0,11–0,19	0–0,09
% monocitov	1–9	0,7–2,6	3–12	0–<4	2,5	1,78–2,42	0–3,2
% Foa - Kurloffovih celic			3–4				
št. trombocitov [n . 10 ⁹ /L]	158–650	100–1000	250–850	500–1300	670–1000		178–252

Preglednica 2: Biokemijske vrednosti nekaterih sestavin krvnega seruma.

Parameter	Miš*	Podgana*	Budra	Kunec	Zlati hrček**
skupni proteini [g/100 ml]	3,3–15,1	6,5–7,5	4,5–5,9	5,0–7,5	2,5–7,5
globulini [g/100 ml]	0,6	1,7–2,6	1,7–2,6	1,5–2,7	
albumini [g/100 ml]	2,7–47,1	3,2–4,6	2,3–3,0	2,7–5,0	1,32–6,5
glukoza [mg/100 ml]	57,1–205,9	93,8–131,9	80–110	74–148	65,5–116,6
[mmol/L]	3,17–11,43	5,20–7,32	4,44–6,10	4,11–8,21	3,63–6,47
trigliceridi [mg/100 ml]	29,4–118,1		28–76	50–200	155,7–264,7
serumski lipidi [mg/100 ml]			95–240	150–400	
fosfolipidi [mg/100 ml]			25–75	40–140	
holesterol [mmol/100 ml] [mmol/L]	51,9–180,3 1,3–4,7	82,25–140 2,1–3,6	20–43 0,5–1,1	10–100 0,3–2,6	119,5–193,3 3,1–5,0
Na ⁺ [mmol/L]	152,1–174,6	146,6–153,4	121–126	125–150	144,3–151,7
kloridi [mmol/l]	117,8–133,9	104,9–109	96–98	92–120	102,4–107,6
bikarbonati [mmol/l]	21,9		18–26	12–24	27–32,8
K ⁺ [mmol/L]	7,05–8,85	4,45–7,65	4–6	3,5–7	5,75–7,25
fosfati [mmol/L]	1,7–3,1	1,5–2,8	1,34–1,76	1,28–1,92	1,41–2,10
Ca ²⁺ [mmol/L]	2,22–2,97	2,62–3,22	2,25–2,82	1,5–3,02	3,0–3,64
Mg ²⁺ [mmol/L]	0,45–1,42	0,97–1,44	0,86–1,11	0,82–2,21	0,86–1,11
železo [mmol/L]	76,97–92,72	14,68–62,65			
dušik krvne sečnine (BUN) [mg/100 ml]	28,9–35,1	15–55	15,7–31,5	5–25	27,3–32,1
sečnina [mmol/L]	10,32–12,53	5,35–19,63	5,6–11,24	1,78–8,92	9,74–11,46
kreatinin [mg/100 ml]	0,57–1,55	0,59–0,81	1,0–1,8	0,5–2,6	0,40–0,65
[μmol/L]	50,4–137	52,1–71,6	88,4–159	44,2–239	35,4–57,5
skupni bilirubin [mg/100 ml]	0,2–0,85	0,2–0,67	0,2–0,4	0,2–0,5	0,3 ± 0,13
sečna kislina [mg/100 ml] [μmol/L]		0,89–1,82 52,9–108,2		1,0–4,3 59,5–255	4,1–5,1 243–303,3

* razlike glede na spol in linijo; ** razlike glede na spol in navedbe avtorjev

Preglednica 3: Vrednosti nekaterih encimov v serumu.

Encim (IU/L)	Miš	Podgana	Budra	Kunec	Zlati hrček
alkalna fosfataza	13,3–133,9	40,25–173,7	68–71	10–86	120–132
kisla fosfataza				0,3–2,7	
laktat dehidrogenaza	109–647	163–725	37–63	33,5–129	153,3–320,6
γ-glutamyl transpeptidaza			38–57	10–98	
aspartat transaminaza			38–58		
aspartat aminotransferaza	58,3–328,6	63,3–153,5		20–120	30,6–100,3
alanin aminotransferaza	36,4–185,3	24,9–89	31–51	25–65	18,8–68,6
alanin transaminaza			32–51		
kreatin kinaza		162,5–450	80–130	25–120	295–704
sorbitol dehidrogenaza		12,5–27,5		170–177	
amilaza				200–500	

Preglednica 4: Koncentracija nekaterih hormonov v serumu.

<i>Hormon</i>	<i>Podgana</i>		<i>Miš</i>		<i>Sirski hrček</i>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
LH [ng/ml]	0,16–0,64	0,32–0,64 (osnovne vrednosti) 24,6–32,8 (v poznem proestrusu)	10–40	20–40 (osnovne vrednosti) 1500–2000 (proestrus)	10–30	20–40
FSH [ng/ml]	5,56–11,1 (na svetlobi) 11,1–20,0 (v temi)	2,22–4,44 (osnovne vrednosti) 8,85–13,3 (v estrusu)		80–120 (osnovne vrednosti) 250–300 (proestrus/estrus)	200–300	100–200
prolaktin [ng/ml]	28,6 (v temi) 1,8–10,7 (na svetlobi) 71,4 (po koitusu)	5,4–10,7 (osnovne vrednosti) 71,4–107 (pozni proestrus)	<1 ng/ml	10–20	5–10	10–15 (osnovna) 30 (pozni estrus)
progesteron [ng/ml]		1–5 (zgodnji estrus) 20–30 (prvi dan estrusa) 40–50 (estrus)		5 (proestrus) 35 (pozni proestrus, estrus)		1,0 (osnovna) 10–12 (proestrus) 6–8 (estrus, diestrus)
estradiol [pg/ml]		<10 (osnovna vrednost) 20–30 (drugi dan estrusa) 40–50 (proestrus)		1–5 (osnovna vrednost)		5–10 (osnovna) 300–400 (proestrus)
testosteron [ng/ml]	3	0,5–0,6 (proestrus) 0,1 (estrus)	1,5–2		1,5–2	
rastni hormon [ng/ml]	0,4–80			1–90		
TSH [ng/ml]	2,27–3,4	0,57		300	300	
ACTH [pg/ml]	30–100					
vazopresin [pg/ml]	1–8					
oksitocin [pg/ml]	4–10,5				2,31–3,19	0,33 ± 0,04 (začetek svetlobe)
tiroksin (T4) [µg/100 ml]	4,7–5,5	4,8–5,0	6,9–7,9		3–7	
trijodtironin (T3) [ng/100 ml]	62,5–69,5	80–86			30–80	

Preglednica 5: Koncentracija nekaterih hormonov v serumu.

<i>Hormon</i>	<i>Podgana</i>		<i>Miš</i>	
	♂	♀	♂	♀
prosti T4 [ng/100 ml]	2,157–2,267			
prosti T3 [pg/100 ml]	199,94–217,04			
kalcitonin [pg/ml]	200–1000			
PTH [pg/ml]	140–180	<50–400 (Sprague - Dawley)		
kortikosteron [µg/100 ml]	15–23 (pozno svetlo obdobje) 1–6 (pozno temno obdobje)	70 (pozno svetlo obdobje) 17 (pozno temno obdobje)	9 (začetek temnega obdobja)	40 (sredina temnega obdobja)
aldosteron [ng/100 ml]	12–35 (pozno svetlo obdobje) 4–11 (sredina svetlega obdobja)	25–35 (9–10 h dopoldne)		
adrenalin [pg/100 ml]	180 ± 24 (v spanju) 253 ± 30 (budna, nevznemirjena žival) 460 ± 60 (pri manipulaciji)		0–200	
N-adrenalin [pg/ml]	460 ± 80 (v spanju) 710 ± 110 (budna, nevznemirjena žival) 830 ± 130 (pri manipulaciji)		30–300	

LITERATURA

1. Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal management and welfare. Oxford: University Press, 1996: 114–33.
2. Jacobi RO, Fox GJ, Davisson M. Biology and diseases of mice. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 35–53.
3. Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of mice. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 121–31.
4. Hankenson FC, van Hoosier GL Jr. Biology and diseases of hamsters. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 168–79.
5. Harkness JE, Murray KA, Wagner JE. Biology and diseases of guinea pigs. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 203–31.
6. Donnelly TM, Quimby FW. Biology and diseases of other rodents. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 247–307.
7. Bellezza CA, Concannon PW, Hornbuckle WE, Roth L, Tennant BC. Woodchucks as laboratory animals. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 309–19.
8. Suckow MA, Brammer DW, Rush HG, Chrisp CE. Biology and diseases of rabbits. In: Fox GJ, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002: 329–38.
9. Kryštufek B. Sesalci Slovenije. Ljubljana: Prirodoslovni muzej Slovenije, 1991:113–78.
10. Garms H, Borm L. Živalstvo Evrope. Ljubljana: Mladinska knjiga, 1981: 24–43.
11. Schmidt - Nielsen K. Animal physiology. Cambridge: University Press, 1993: 192–209.
12. Woodman DD. Laboratory animal endocrinology. Chichester: Wiley, 1997: 253–86.

9 FIZIOLOŠKE LASTNOSTI IN UPORABNOST DOMAČIH ŽIVALI V EKSPERIMENTALNE NAMENE

Vojteh Cestnik

OVCA (*Ovis aries*)

V svetu je poznano okoli 200 pasem ovc, ki se delijo na tiste za proizvodnjo mesa, mleka volne ali krzna. Kot poskusne živali se ovce uporabljajo za:

- fiziološke, biokemične in prebavne raziskave prežvekovalcev;
- kardiovaskularne raziskave (vstavljanje zaklopk, umetnih src, ateroskleroza, hemoragični šok);
- raziskave v zvezi s transplantacijami organov;
- imunološke raziskave, proizvodnjo proteinov in protiteles ter njihovo izločanje v mleku;
- fetalne raziskave in reprodukcijo,
- raziskave fotoperiodike;
- raziskave kongenitalnih bolezni (hiperbilirubinemija, pomanjkanje 6-fosfat dehidrogenaze, gangliozidoza, adenomatoza);
- raziskave zastrupitev z bakrom;
- raziskave metabolične toksikoze;
- parazitološke raziskave;
- raziskave zoonoz.

Posebnosti prebave pri prežvekovalcih

Ovce so prežvekovalci, kar pomeni, da požrto hrano spet vračajo v ustno votlino, kjer jo ponovno prežvečijo. Najpomembnejši procesi prebave potekajo v predželodcih, ki so se filogenetsko in ontogenetsko razvili iz požiralnika. Predželodci so: vamp (*rumen*), kapica (*reticulum*) in prebiralnik (*omasum*). Del, ki je identičen želodcu pri monogastridih, pa je sirišnik (*abomasum*). Predželodci imajo brezžlezno ali kutano sluznico, ki je nekoliko poroženela, sirišnik pa ima žlezno sluznico. Želodec prežvekovalcev je sestavljen, večvotlinski.

Vamp je najobsežnejši del prežvekovalčevih prebavil. Notranjo steno oblaaga kutana sluznica, ki je posuta z nitasto, listasto ali kijasto oblikovanimi papilami. Vampova stena je zelo čvrste zgradbe, njen osnovni element je gladka mišičnina. Na nekaterih mestih, kjer so razvrščene močne mišične grede, je stena še posebej odebeljena. Grede, ki imajo velik pomen pri motoriki vampa, obenem razmejujejo vamp na posamezne predelke, imenovane vampove vreče. Močna mišična plast se nahaja tudi v ruminoretikularni sluznični gubi, ki loči kapico od ventralne vampove vreče. Od ustja požiralnika do odprtine med kapico in prebiralnikom (kapično-prebiralnikovo ustje *ostium reticulo-omasicum*) potekata paralelni gubi sluznice z mišičnimi plastmi. To sta ustnici želodčnega žleba.

Kapica je okrogla in v kavdalni smeri prehaja v vamp. Kutana sluznica ima tanke, medsebojno povezane gube, ki tvorijo satast oziroma mrežast videz. Zaradi njega je kapica dobila latinsko ime *reticulum* (mrežica).

Prebiralnik je izrazito okrogel, njegova notranjost pa je razdeljena s številnimi vmesnimi sluzničnimi gubami. Gube, ki se imenujejo tudi listi, so po velikosti različne in se delijo na liste prvega, drugega, tretjega in četrtega reda. Papile na listih so poroženele. Kapica in prebiralnik sta povezana prek kapično-prebiralnikovega ustja, iz katerega poteka kratek, širok žleb, ki se konča s prebiralnikovo-sirišnikovim ustjem. Z njim je prostor prebiralnika povezan s prostorom sirišnika.

Vamp obsega levo polovico trebušne votline, kapica se dotika prepone. Prebiralnik sega na desno polovico trebušne votline, sirišnik zavzema spodnji del trebušne votline.

Kemična razgradnja hrane v predželodcih temelji na delovanju/aktivnosti encimov mikrobnega izvora v vampu. Mikroorganizmi v predželodcu so bakterije, protozoi in glivice. Bakterije in protozoi s svojimi encimi sodelujejo pri kemičnih procesih razgradnje snovi v hrani, glivice zaradi porabe kisika ustvarjajo anaerobne pogoje, ugodne za obstoj bakterij in protozojev. Bistvena vloga mikrobnih encimov je razgradnja celuloze, ki jo prežvekovalci lahko izkoristijo. Zaradi mikrobnih encimskih procesov poteka prebava pri prežvekovalcih bistveno drugače kot pri drugih živalih.

Dokler se žival hrani samo z mlekom, je funkcionalni del želodcev siriščnik, ki je tudi največji del želodcev. Ko pa se žival prične hraniti z voluminozno hrano, prevzemata glavno funkcionalno vlogo vamp in kapica, katerih delež se povečuje, medtem ko se delež siriščnika zmanjšuje.

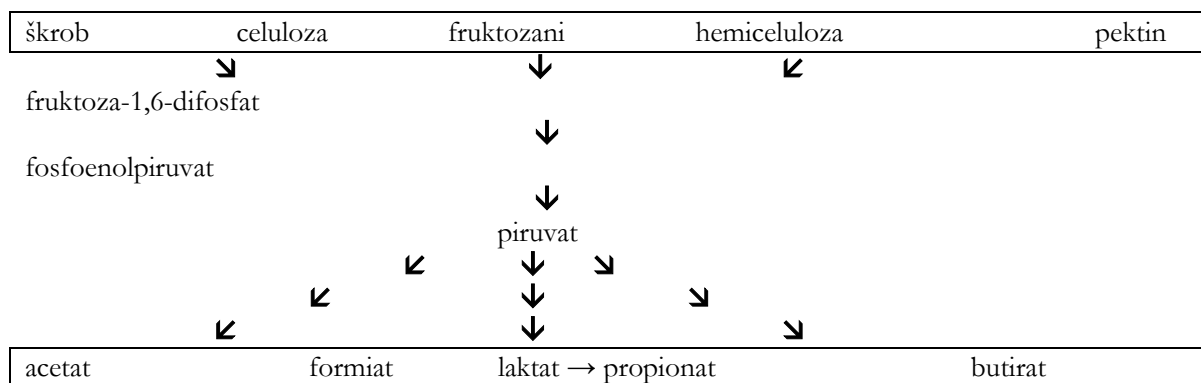
Preglednica 1: Razmerje med vampom in kapico ter prebiralnikom in siriščnikom pri ovcah različne starosti.

Starost	Vamp in kapica	Prebiralnik	Siriščnik
1 dan	31	8	61
2 tedna	36	5	59
1 mesec	63	5	32
1,5 meseca	71	5	24
3 meseci	73	6	21
odrasla žival	69	8	23

Prebava ogljikovih hidratov

Hrano prežvekovalcev sestavljajo: celuloza, škrob, pektini (polimeri galakturonske kisline), hemiceluloze (polisaharidi, sestavljeni iz pentoz, metil-pentoze, heksoze in glukuronskih kislin), fruktozani (polisaharidi fruktoze), sahara, fruktoza in glukoza.

V prvi fazi prebave ogljikovih hidratov nastane piruvat ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$). Proces je dvofazen, kemično identičen tistemu pri nastanku piruvata pri anaerobni glikolizi. Piruvat lahko nastane tudi z deaminacijo nekaterih aminokislin. V drugi fazi pa se piruvat pretvori v hlapne maščobne kisline: očetno, propionsko in masleno kislino, v približnem razmerju 65:20:10. Te kisline se hitro resorbirajo skozi steno vampa in so vzrok posebnosti presnove prežvekovalcev.



Slika 1: Prebava ogljikovih hidratov.

Prebava beljakovin in hepatoluminalno kroženje amoniaka

Pod vplivom bakterijskih proteaz se beljakovine hrane najprej razgradijo na aminokisline. Te se lahko vgradijo v telesa mikroorganizmov (predvsem protozojev) ali pa se nadalje razgradijo. Pri oksidacijski dezaminaciji nastanejo ketokisline, pri hidrolitični dezaminaciji oksikisline in pri redukcijski dezaminaciji nižje maščobne kisline. Pri dekarboksilaciji (odcepljanju CO_2) nastanejo amini in diamini.

Pri dezaminaciji aminokislin, hidrolizi sečnine in pri redukciji nitratov nastane amoniak. Ta se najprej resorbira skozi steno vampa v kri. S krvjo potuje v jetra, kjer se v biokemičnem procesu (ciklus uree) veže z ogljikovim dioksidom in pretvori v sečnino ali ureo. Ta prehaja v kri in se v največji meri izloča skozi ledvice s sečem, deloma pa prehaja v žleze slinavke in iz njih s slino v vamp. Manjši del sečnine preide iz krvi neposredno v vamp skozi njegovo steno s pomočjo prenosnikov za sečnino. Tu se pod vplivom bakterijskega encima ureaze ponovno razgradi na amoniak in ogljikov dioksid. Amoniak torej kroži med vampom, jetri in slinavkami, kar imenujemo hepatoluminalno kroženje dušika ali amoniaka. Iz sproščenega amoniaka bakterije lahko ponovno sintetizirajo aminokisline. Vezava amoniaka poteka tako, da se ta veže na kisline, nastale v procesih prebave ogljikovih hidratov. Zelo pomembna je piruvična kislina, ki nastaja v velikih količinah pri prebavi ogljikovih hidratov. Po vezavi aminoskupine nastane aminokislina alanin. To je način, zaradi katerega lahko prežvekovalci preživijo tudi s hrano, ki je revna z beljakovinami. V vampu torej poteka sinteza aminokislin na novo (*de novo*).

Prebava maščob

Maščob je razmeroma malo v hrani prežvekovalcev. Te se najprej razgradijo na višje maščobne kisline in glicerol. Višje maščobne kisline v vampu v glavnem ne podležejo razgradnji z β -oksidacijo, večinoma ostanejo nespremenjene in se resorbirajo v tankem črevesu. Glicerol z izgubo H_2O preide v propionsko kislino. Nižje maščobne kisline, nastale pri procesih prebave ogljikovih hidratov, se pretvarjajo v daljše verige. Osnova je propionska kislina, ki se veže s CoA, nastane pa aktivirana propionska kislina (propionil CoA). Nanjo se postopoma vežejo molekule aktivirane očetne kisline (acetil CoA) in nastanejo maščobne kisline s 15 ali 17 C atomi.

V vampu nastajajo tudi maščobne kisline z razvejano verigo, ki so značilne za prežvekovalce in se nahajajo v maščobi in mleku. Nastanejo z dezaminacijo aminokislin. Valin preide v izomasleno kislino, levcin v 2-metil masleno in izolevcin v izovaleriansko kislino. Te se lahko dograjujejo podobno kot propionska kislina – do verig s 13 do 17 C atomi.

Nenasičene maščobne kisline, ki jih je veliko v listih zelenih rastlin in za katere je značilna dvojna vez, se pretvarjajo iz cis- v trans- obliko in z vezavo vodika v nasičene maščobne kisline. Zaradi pretvorbe nenasičenih v nasičene maščobne kisline ima maščoba prežvekovalcev (loj) velik delež nasičenih maščobnih kislin in zato višjo topnost. Nenasičene esencialne maščobne kisline (linolna, linolenska in arahidonska) se vgrajujejo v maščobo protozojev in iz njih izidejo, ko ti propadejo in se razgradijo v siriščniku in dvanajstniku.

Nastanek plinov

Pri procesih biokemične razgradnje med prebavo nastajajo tudi plini. Največ je ogljikovega dioksida in metana, nastaja tudi amoniak, v sledovih pa najdemo tudi kisik, vodik in žveplovodik. Količina nastalega plina je odvisna od intenzivnosti biokemičnih procesov in vrste hrane ter se spreminja s časom po hranjenju. Plini se odstranjujejo s procesom izrigavanja ali eruktacije. Pri tem dejanju mišičnina kapice in preddvora ohlapne, s čimer se gladina vampove vsebine zniža pod mesto vstopa požiralnika v kapico. Sledi krčenje dorzalne vampove vreče v smeri naprej in odpiranje požiralnika, zaradi česar plini vstopijo v požiralnik in nato v zunanji svet. Izrigavanje plinov in dihanje sta medsebojno usklajena. Odrasla ovca lahko v eni uri odstrani do 5 litrov plinov.

Resorpcija v predželodcih

V predželodcih se dobro resorbirajo hlapne maščobne kisline. Resorpcija vode v kapici in vampu je slaba, zato je vsebina v teh dveh predželodcih tekoča. Dobra resorpcija vode je v prebiralniku. Iz predželodcev se v manjšem, fiziološko nepomembnem obsegu, resorbirajo tudi nekatere mineralne snovi in aminokisline.

Gibanje predželodcev

Gibanje predželodcev uravnava poseben center v možganskem deblu. Ta sprejema aferentne dražljaje iz receptorjev v vampovi steni in posebno gubah. Zmerna napolnjenost vampa in znižana koncentracija glukoze v krvi pospešujeta gibanje. Center pošilja eferentna vlakna v predželodce po vagusu. V predželodcih je sicer močno avtonomen notranji živčni pletež, vendar so impulzi, ki prihajajo po vagusu, zelo pomembni za normalno delovanje predželodcev. Primarno krčenje se prične s krčenjem kapice. Ko se ta skrči na približno polovično velikost, zastane, nato se skrči popolnoma. Že med drugim krčenjem kapice se dorzalna vampova vreča krči v kavdalni smeri in nato še ventralna vreča v kranialni smeri. Sekundarna krčenja se sicer ne pojavljajo redno, kadar pa se, neposredno sledijo primarnim. Med drugo fazo krčenja kapice se dorzalna vampova vreča skrči v kranialni smeri (ekstraruminalna kontrakcija vampove vreče, ki se pojavi pri izrigavanju plina) ali pa se po primarnem ciklusu dorzalna in ventralna vampova vreča ponovno skrčita. Frekvenca ciklusov je pri drobnici 7–14 v 5 minutah.

Med gibanjem kapice in vampa se odpira kapično-prebiralnikovo ustje, odprtina med kapico in kanalom, ki vodi v prebiralnik. Ta odprtina zadržuje vlaknaste delce, katerih dolžina presega 2 cm in deluje nekako tako kot pilorus (vratar) v želodcu monogastridov.

Želodčni žleb

Želodčni žleb je sluznična tvorba z gladkimi mišicami, ki poteka od kardije prek svoda kapice do kapično-prebiralnikovega ustja. Pomembno vlogo ima pri mladih živalih ob sesanju mleka. Takrat se ustnice žleba skrajšajo, dvignejo in stisnejo skupaj, zaradi česar nastane cev, ki poteka od kardije do kapično-prebiralnikovega ustja. Mleko pri sesajočih živalih zato prehaja iz požiralnika skoraj neposredno v sirišnik, samo okoli 10 odstotkov ga preide tudi v vamp. Mleko tudi hitro preide prebiralnik in vstopi v sirišnik. S starostjo se refleks izgublja in pri odraslih živalih izgine, vendar se lahko pojavi ob hudi žeji. Zapiranje žleba je v tem primeru stimulirano z antidiuretičnim hormonom. V tem primeru zapiranje žleba omogoči, da voda hitro preide neposredno v črevo, kjer se resorbira.

Prebava v prebiralniku

Ko vsebina preide v prebiralnik, tekočina deloma izteče naprej v sirišnik, deloma pa delci prehajajo med liste prebiralnika, kjer se iztisne tekočina. Med listi se vsebina zaradi dobre resorpcije vode osuši in zaradi medsebojnega gibanja listov zdrobi.

Prebava v sirišniku

Sirišnik mladih živalih vsebuje encim labferment (himozin, renin, sirilo), ki je pomemben pri koagulaciji mleka. Nastanejo grudasti skupki, ki se pod vplivom pepsina razgradijo. Pri odraslih živalih so procesi prebave identični s procesi v enodelnem želodcu monogastridov.

Posebnosti presnove prežvekovalcev

Koncentracija glukoze pri odraslih prežvekovalcih je nižja kot pri drugih sesalcih, ker so vir energije v procesih v vampu nastale maščobne kisline. Pri mladih prežvekovalcih, predvsem pri tistih, ki še sesajo mleko, so vrednosti podobne kot pri monogastridih. Bolj ko žival prejema rastlinsko hrano in s tem vzpostavlja bakterijsko prebavo v vampu, bolj se koncentracija glukoze v krvi znižuje.

Preglednica 2: Koncentracija glukoze pri nekaterih vrstah živali in človeku.

Vrsta	mmol/L	Vrsta	mmol/L
konj	3,08–5,32	koza	2,24–3,92
govedo	1,96–3,36	prašič	4,48–5,32
tele (1–2 tedna)	5,04–6,16	pes	3,36–5,04
tele (4–5 tednov)	4,40–5,60	kunec	3,92–6,16
tele (5–6 tednov)	2,24–2,78	budra	3,36–7,00
ovca	1,68–3,36	podgana	3,36–4,48
jagnje (2–4 tednov)	4,48–6,16	kokoš	6,72–11,20
jagnje (6–9 tednov)	3,36–3,92	človek	4,48–6,72

Manjši del očetne kisline pri prehodu skozi jetra oksidira, večji del pa vstopa v kri, od tod pa v maščobno tkivo, mišice, mlečno žlezo in druga tkiva. V tkivnih celicah se očetna kislina s pomočjo encima acetat-tiokinaze (acetil-CoA sintetaza) pretvarja v acetil-CoA (imenovan tudi aktivirana očetna kislina). Aktivnost tega encima v tkivu prežvekovalcev je približno 3-krat večja kot pri neprežvekovalcih. Največji del acetil-CoA se izrabi za sintezo maščobnih kislin.

Skoraj vsa propionska kislina, ki se resorbira iz vampa in prehaja v portalni krvni obtok, se v jetrih s procesom glukoneogeneze pretvarja v glukozo. Propionska kislina oz. propionat se pretvarja v sukcinil-CoA in nato v sukcinat, ki preide v oksalacetat, ta pa v fosfoenol-piruvat ter nato v glukozo. Tudi druge maščobne kisline, ki se resorbirajo iz vampa, vstopajo v Krebsov cikel na ravni acetil-CoA.

Posebnosti termoregulacije

Pri ovcah je v volni zajeta plast zraka pomemben termoizolator, ki preprečuje ohlajevanje ali segrevanje živali. Ovce oddajajo odvečno toploto deloma s potenjem in deloma s pospešenim dihanjem.

Pri ovcah (in drugih prežvekovalcih pa tudi prašičih in mačkah) obstaja anatomska posebnost krvnega obtoka in protitočnega mehanizma izmenjave toplote. Pri teh živalih se zunanja karotidna arterija na bazi možganov razdeli na številne arteriole, ki se ponovno združujejo pred vstopom v možgane. Arteriole ležijo v velikem venoznem sinusu, polnem krvi, ki prehaja iz nosnih poti, kjer se je ohladila. Zaradi izmenjave toplote se arterijska kri, preden vstopi v možgane, ohladi. Posledica tega je, da je temperatura možganov za 2–3 °C nižja od ostalega telesa.

Razmnoževanje

Penis pri prežvekovalcih je fibro-elastičnega tipa, kar pomeni, da vezivno tkivo prevladuje nad brecilnim, zato je penis čvrst, tudi kadar ni nabrekel. Penis oblikuje tudi krivuljo v obliki črke S. Količina **ejakulata** pri ovnu je 1 (0,3–3,5) ml.

Maternica (uterus) vseh domačih živali ima kratko telo (*corpus uteri*) in dolga rogova (*cornua uteri*), v katerih se razvije plod. Rogova sta različno dolga, vijugasta, na kranialnem delu prehajata v jajcevod. Če ovulaciji ne sledi oploditev in ne pride do brejosti, se endometrij pri domačih živalih ne lušči, ampak povrne na začetno debelino (**regresija endometrija**).

Glede na število **spolnih ciklusov**, ki se zvrstijo tekom leta, so ovce **sezonsko poliestrične**, pojavljajo se ciklusi se pojavljajo od oktobra do decembra in nato izginejo. Celoletna poliestričnost nekaterih pasem ovc (med njimi tudi jezersko solčavskih) je glede na novejša raziskave vprašljiva.

Po kopulaciji spermiji pri ovci potuje do mesta oploditve od 6 minut do 5 ur. Oplodeno jajčece vstopi v uterus 3 do 4, ugnezdi (implantira) pa se 15 do 18 dni po oploditvi. **Brejost** traja pri ovci 144–157 dni (5

mesecev). Med brejostjo se masa maternice poveča 8–18-krat. **Prva ovulacija** po porodu se pri celoletno poliestričnih ovcah pojavi približno 38. dan, pri sezonsko poliestričnih 5. ali 6. mesec.

Placenta pri prežvekovalcih je epiteliohorialnega tipa, kar pomeni, da je slabo prepustna za imunoglobuline. Ti ne prehajajo iz krvi matere v plod, zato se mladiči skotijo brez ustrezne pasivne zaščite. To pridobijo s **kolostrumom**, ki vsebuje veliko imunoglobulinov. Sluznica črevesja novorojenih živali je za imunoglobuline najbolj prepustna prvih 12 ur po porodu, kasneje se prepustnost zmanjšuje, po 24 urah pa imunoglobulini ne morejo več preiti v kri. Zato je zelo pomembno, da mladiči dobijo kolostrum kmalu po rojstvu.

PRAŠIČ (*Sus scrofa dom.*)

Glavna rejna tipa prašičev različnih komercialnih pasem sta maščobni in mesnati. Večina teh živali doseže spolno zrelost in klavno težo 250–280 kg pri 5 do 6 mesecih starosti. Vendar se prašiči komercialnih pasem redkeje uporabljajo v poskusih, razen v primerih proučevanja procesov fiziologije, prehrane ali rasti. Kadar pa se tovrstne prašiče vendarle uporabi, so to navadno 15–30 kg težke živali, stare 8–12 tednov, s tedenskim prirastom 2–5 kg. Za eksperimentalne namene so uporabne predvsem pritlikave (miniature) pasme prašičev, ki dosežejo spolno zrelost pri telesni masi 30–50 kg. Prašiči se uporabljajo za:

- preučevanje kardiovaskularnih obolenj (ateroskleroza, stenoza koronarnih arterij, infarkt, prirojene srčne bolezni, septični in hemoragični šok) in elektrofiziologije;
- preučevanje uporabe vsadkov in transplantacij (srca, pljuč, jeter, ledvic, črevesja) ter za raziskave v plastični kirurgiji;
- preučevanje von Willebrandove bolezni;
- preučevanje gastrointestinalnih in metaboličnih procesov ter bolezni (želodčni ulkus, nekrozni enterokolitis);
- preučevanje parenteralne prehrane;
- preučevanje renalnih in uroloških bolezni (renalna hipertenzija, veziko-uretralni refluks, intrarenalni refluks, uretralna obstrukcija);
- laparoskopske in kirurške preiskave ter vaje (kateterizacija);
- druge kirurške raziskave (fetalna kirurgija, kirurgija mišic in skeleta, nevrokirurgija, gastrointestinalna, urogenitalna, kardiopulmonalna kirurgija);
- sistemska in dermalna toksikologija;
- imunološke raziskave;
- preučevanje diabetesa, malignega melanoma in maligne hipertermije.

Posebnosti prebave pri prašičih

Prašiči so omnivori monogastridi, tako kot človek, vendar je zgradba prebavil drugačna. Požiralnik je skoraj v celoti zgrajen iz prečnoprogaste mišičnine, gladka je samo na koncu požiralnika, neposredno pred vstopom v kardio. Želodec je velik, z vrečasto razširitvijo na kardialnem delu velike krivine. Uvrščamo ga med enovotlinske sestavljene želodce. Debelo črevo tvori spiralni zavo v obliki turbana. Procesi prebave so precej podobni kot pri drugih monogastridih. Če se živali hranijo z rastlinsko hrano, potekajo prebavni procesi podobno kot pri herbivorih, pri hranjenju s hrano živalskega porekla pa bolj podobno tistim pri karnivorih.

Posebnosti termoregulacije

Tudi pri prašičih je, tako kot pri prežvekovalcih, vzdrževanje stalne temperature krvi v možganih posledica anatomske zgradbe krvnega obtoka in protitočnega mehanizma izmenjave toplote. Prašiči imajo znojnice le pod pazduho, vzdolž bele črte na trebuhu, na presredku in okoli anusa, kar pomeni, da znojenje ni pomemben način oddajanja toplote. Z namenom ohlajanja telesa se valjajo v vodi ali blatu in tako nanašajo tekočino na telesno površino. Ta z izhlapevanjem ohlaja telo.

Posebnosti endokrinega sistema

Ščitnica pri prašiču je zgrajena iz treh režnjev. Tretji ali srednji režen, ki je pri drugih živalih le trak veznega tkiva, je pri prašičih izrazito oblikovan.

Razmnoževanje

Penis je tako kot pri ovnu fibro-elastičen in oblikuje krivuljo v obliki črke S. Konec penisa je spiralasto zavrt. Količina **ejakulata** pri merjascu je 200 (100–500) ml.

Maternica je zgrajena podobno kot pri drugih večrodnih samicah, kar pomeni, da sta rogova zelo dolga. Svinje so **poliestrične**, pojatve se pojavljajo redno, vsake 3 tedne. Po kopulaciji potujejo spermiji do mesta oploditve povprečno 15 minut, implantacija pa nastopi 14 do 20 dni po oploditvi.

Brejest traja 115 dni (3 mesece, 3 tedne, 3 dni), med brejestjo se masa maternice poveča 10–15-krat. **Puerperij** traja 12–14 dni, prva ovulacija pa nastopi 7–10 dni po odstavitvi. Tudi pri svinji je placenta, tako kot pri prežvekovalcih, epiteliohorialnega tipa.

PES (*Canis familiaris*)

Izvorna vrsta vseh pasem psov, ki jih je danes okoli 450, je volk (subsp. *C. lupus pallipes*, *C. lupus chanco*). Med pasmami so razmeroma velike razlike ne samo v videzu, ampak tudi v telesni masi. Najmanjše pasme tehtajo okoli 1 kg, največje prek 60 kg.

Najpogosteje uporabljena pasma psov je beagle, ki se uporablja za biokemijske, farmakološke, toksikološke, kardiovaskularne, dentalne in periodentalne raziskave, v dentalni in ortopedski kirurgiji ter onkologiji, za proučevanje kužnih bolezni psov, v urologiji, oftalmologiji itd. Druge, predvsem velike pasme psov (nemški ovčar, doberman, labradorec, zlati prinašalec, mešanci) so uporabljive predvsem za kirurške, ortopedske, transplantacijske in biokemijske raziskave. Nekatere pasme, pri katerih se pojavljajo prirojene bolezni, so primerne za njihovo preučevanje. Pri pasmi škotski ovčar se pojavljata prirojena ciklična hematopoeza in periodična fluktuacija nevtrofilcev, pri zlatem prinašalcu se pojavlja mišična distrofija, pri bedlingtonskem terierju wilsonova bolezen, za katero je značilno kopičenje bakra. Pasma labradorec, zlati prinašalec, doberman, bokser, bouvier, koker španjel, beagle, shih tzu, maltežan in šnavcer imajo predispozicijo za hipotiroidizem, jazbečar, pudelj, bokser, labradorec, cairnski, beli višavski in bostonski terier pa za cushingov sindrom.

V zadnjih desetletjih se je število psov, uporabljenih v eksperimentalne namene, močno zmanjšalo, vzroki za to pa so predvsem: etični odnos do živali, javno mnenje, višje cene, zmanjšana dostopnost zaradi restriktivnejše zakonodaje, uporaba drugih živalskih modelov, premik od patofizioloških modelov k molekularni biologiji in genetiki.

Posebnosti prebave psov

Psi so izvorno mesojedi in imajo razmeroma enostavno zgrajena in kratka prebavila. Kemični procesi prebave temeljijo na encimih, ki jih izločajo žleze.

Termoregulacija

Psi po telesu nimajo razporejenih znojnic, zato ne uravnavajo telesne temperature s potenjem. Pri povišani temperaturi se frekvenca dihanja, ki je v mirovanju 30–40 vdihov/min, poveča na 300–400 vdihov/min. Pri tem žival okoli 2/3 zraka vdihne skozi nos in izdihne skozi usta. Obenem se poveča dotok krvi v ustno sluznico in izločanje sline. Zaradi pohitrenega dihanja se pospeši izhlapevanje s površine sluznice, ki se zato ohladi, posledično pa se ohlaja tudi venozna kri, ki se vrača v obtok.

Močno pospešeno dihanje pa je zelo plitvo, zaradi česar se odstranjevanje CO₂ iz telesa ne poveča in se vrednost pH ne spremeni. Čeprav je gibanje prsnega koša veliko bolj intenzivno kot v mirovanju, je pri tem mišično delo minimalno, ker pride do elastičnega nihanja (rezonančne frekvence) prsnega koša. Dodatna produkcija telesne toplote je zato zanemarljiva.

MAČKA (*Felis catus*)

Neposredna prednika domače mačke sta najverjetneje divja (*Felis silvestris*) in nubijska (*F. lybica*) mačka. V zadnjem času se število mačk, uporabljenih v eksperimentalne namene, zmanjšuje. Kot poskusne živali mačke uporabljajo:

- v eksperimentalni nevrologiji in pri proučevanju spanja;
- v oftalmologiji;
- v farmakologiji, predvsem pri proučevanju vpliva različnih snovi na krvni tlak;
- pri proučevanju prirojenih in imunodeficientnih bolezni;
- pri proučevanju bolezni, povzročenih z retrovirusi;
- v onkologiji (limfoidna obolenja);
- pri proučevanju helikobakterioze (*Helicobacter felis*).

Nekatere fiziološke posebnosti

Tudi mačka je mesojed, zato so **prebavni procesi** podobni kot pri psu.

Termoregulacija je z vzdrževanjem konstantne temperature krvi v možganih urejena podobno kot pri prežvekovalcih in prašiču.

DIHUR (*Mustela putorius fugo*)

Dihur sodi v družino *Mustelidae*, ki najverjetneje izvira iz eocena. V naravi je vrsta zelo prilagojena na različne ekosisteme. Domestifikacija je bila izvedena približno pred 2000 leti, z namenom uporabe živali za lov na kunce. Danes so dihurji tudi hišni ljubljenci.

Uporabnost dihurjev kot poskusnih živali:

- virologija;
- reprodukcijska fiziologija;
- endokrinologija, nevroendokrinologija;
- nevroanatomija;
- kardiologija;
- pulmologija.

Nekatere anatomske in fiziološke posebnosti

Toraks je dolg in ozek, razmeroma dolg sapnik omogoča proučevanje trahealne fiziologije (pediatrična intubacija). Pljuča so razmeroma velika, totalna pljučna kapaciteta je približno 3-krat tolikšna, kot bi bila glede na velikost živali. Dihalno drevo je zelo razvejano, v pljučih je tudi veliko bronhialnih submukoznih žlez. Zato so živali primerne za študije pljučnih bolezni.

Paraanalne žleze so dobro razvite, vendar zaradi neprijetnega vonja pogosto odstranjene. Izločanje kožnega loja je intenzivno in je lahko dodatni vzrok neprijetnega vonja.

Pogosta je ekstramedularna hematopoeza v vranici, kar je lahko vzrok za splenomegalijo.

Svetloba ima močan vpliv na reprodukcijo in razvoj. Pri umetni osvetlitvi 8 ur svetlobe in 16 ur teme mladiči dosežejo puberteto med 10. in 12. mesecem. Pri prehodu iz kratke na dolgo fotoperiodo pred 90. dnevom starosti ostanejo živali anestrčne.

KOKOŠ (*Gallus domesticus*)

V eksperimentalne namene se uporabljajo kokoši (piščanci), golobi, vodna perutnina in druge ptice.

Posebnosti okostja kokoši

Skeletni sistem je pri perutnini oblikovan drugače kot pri sesalcih. Na okostju glave sta izraziti veliki očnici. Najmočnejša kost obraznega dela je zobna kost, ki ustreza spodnji čeljustnici pri sesalcih. Posebnost je tudi štirikotnica (*os quadratum*), ki se povezuje z lobanjskimi kostmi.

Kokoš ima 14 vratnih in 6 prsnih vretenc. Prvih 5 prsnih vretenc je zraslih v kost, ki se imenuje *notarium*. Ledvena, križna in prva repna vretenca so združena v kost *sinsakrum*, nekaj repnih vretenc je prostih, zadnja repna vretenca pa oblikujejo jurično kost ali *pigostil*. Sinsakrum sodeluje pri oblikovanju medenice.

Prvi par nepravih reber ne dosega prsnice. Ostalih 6 parov so prava rebra, ki so iz dveh delov in segajo od notariuma do prsnice. Prsnica je obsežna ploščata kost z globokim gredljem.

Prsni par okončin sta perutnici. Kosti plečnega obroča imajo razvito krokarnico in ključnico. Razviti so trije prsti, od katerih je najbolj razvit drugi. Prvi prst ima dve, drugi in tretji pa po tri prstnice. Na zadnji okončini nartnice niso samostojne koščice, zgornja vrsta je zraščena z golenico, spodnja pa s stopalnico. Štirje prsti imajo različno število prstnic. Prvi prst, ki je obrnjen nazaj, ima samo dve prstnici, drugi prst ima tri, tretji štiri, četrti pa pet prstnic.

Posebnosti prebave in presnove

Perutnina ima nekaj značilnosti v zgradbi in delovanju prebavnega sistema. Osnovne specifičnosti so kljun, golša, dvodelni želodec, dve slepi črevesi in kloaka, ki je skupno izvodilo prebavil, uropoetskega in genitalnega kanala.

Golša (*ingluvies*) je vrečasta razširitev požiralnika, ki se med hranjenjem napolni, šele ko se je napolnil želodec. Dokler je mlin prazen, je odprtina, ki vodi v golšo, zaprta. Ko pa se mišični želodec napolni, mišični tonus popusti in hrana preide v golšo. Prazna golša se krči v presledkih od 60 do 90 sekund. Ko se napolni, krčenje preneha. Golša ima funkcijo kratkotrajnega skladišča hrane, kjer se hrana zadržuje od 2 do 20 ur. V tem času se prepoji s slino. V golši ne potekajo pomembni procesi prebave, v manjši meri pride do razgrajevanja ogljikovih hidratov pod vplivom slinske amilaze. Praznjenje golše poteka v obliki močnih površinskih valov stene, ki postajajo močnejši od krčenja do krčenja. Prvo krčenje se pojavi na ventralni strani golše in prehaja v smeri proti požiralniku tako, da se vsebina prazni v požiralnik. Krčenja golše pospešuje parasimpatični živčni sistem. Vendar se vsebina golše lahko ponovno vrne nazaj vanjo, če je količina prevelika, da bi naenkrat prešla v mlin.

Kokoš ima **dvodelni želodec**, ki se deli na žleznega in mišičnega (mlinček). Ko pride hrana iz požiralnika ali iz golše v žlezni želodec, se tu dobro prepoji z želodčnim sokom. Želodčni sok nastaja v oksipeptičnih žlezah, kjer se tvori solna kislina in pepsin. Iz žleznega preide vsebina v mišični želodec, kjer se zaradi prepojenosti z želodčnim sokom nadaljujejo kemični procesi prebave. Na steni se nahaja debela in čvrsta, vendar elastična plast, ki je proizvod tubularnih žlez v steni želodca. To je polisaharidno-proteinski kompleks, **koilin**, ki tvori osnovno maso. Iz tubularnih žlez izhaja filamentna struktura, ki je vložena v kolinsko maso, na površini pa filamenti predstavljajo zobčaste nastavke. Naloga obloge je varovati steno mlina pred mehničnimi poškodbami zaradi drobljenja hrane in obenem drobiti hrano.

Tudi pri pticah je tanko črevo najpomembnejše mesto v prebavnih procesih. V njem se izločajo prebavni sokovi, razgrajujejo hranilne snovi in resorbirajo osnovne sestavine. V dvanajstniku ni Brunnerjevih žlez, zato črevesni sok v tem področju izhaja iz Lieberkühnovih kript. Pri večini ptic je debelo črevo sestavljeno iz parnih slepih čreves in razširitve črevesa. Pomembna je resorpcija vode in sinteza vitaminov.

Koncentracija glukoze v krvi je v primerjavi s sesalci visoka (Preglednica 1).

V procesih metabolizma nastali amoniak se detoksicira tako, da se pretvori v sečno kislino in ne v sečnino kot pri večini drugih živali.

Posebnosti dihanja

Pljuča ptic nimajo serozne opne in niso vpeta med visceralno in parietalno opno kot sesalska, zato tudi ni interplevralnega prostora. Pljuča niso elastična in so z vezivnim tkivom čvrsto prirastena na rebra in ledvena vretenca. Namesto alveol imajo mrežo zelo drobnih kanalčkov. Funkcionalni del pljuč so respiratorni bronhioli ali zračne kapilare, ki so obloženi z dihalnim epitelom. Pljuča imajo dve krili. V vsako vstopa po en bronhus, imenovan mezobronhus. Ta vodi zrak pretežno v zadnje zračne vrečke. Volumen pljuč predstavlja le 10 do 15 odstotkov volumna vsega dihalnega sistema. Ptice nimajo dihalne prepone, zato sta prsna in trebušna votlina funkcionalno združeni.

Posebnost dihalnega sistema pri teh živalih so tudi **zračne vrečke**. Večina ptic ima 9 zračnih vrečk, ki so razdeljene na sprednje (anteriorne) in zadnje (posteriorne). Prednjih vrečk je pet, in sicer: neoarna interklavikularna, parni cervikalna in anteriorna torakalna. Zadnje vrečke so štiri: parni posteriorni torakalni in parni abdominalni. Vrečke so v stiku z nekaterimi pnevmatiziranimi kostmi. Iz zračnih vrečk vodijo v pljuča t. i. rekurentni bronhiji.

Med vdihom se prostornina prsnega koša poveča v prečni (tranverzalni) in vzdolžni (dorzo-ventralni) smeri. Pri tem tlak v prsno-trebušni votlini pade in zrak vstopi v dihalni sistem. Napolnijo se predvsem zadnje dihalne vrečke. Pri izdihu se prostornina prsno-trebušne votline zmanjšuje, zrak prehaja iz zadnjih vrečk v pljuča. Pri naslednjem vdihu preide zrak v sprednje zračne vrečke, pri izdihu pa ven. Dihanje pri pticah je tako dvofazno.

Posebnosti sestave krvi

Pri pticah so, tako kot pri plazilcih, dvoživkah in ribah, **eritrociti** prave celice z jedrom in drugimi celičnimi organeli. So podolgovate oblike, velikosti 12 x 7,5 µm. **Trombociti** ali vretenaste celice imajo ovalno jedro in so dolge 8–10 in široke 5–7 µm.

Posebnosti ekskrecije

Ptice sodijo med urikotelične vrste, kar pomeni, da se amoniak detoksicira tako, da nastane sečna kislina. Sesalci, ki izločajo sečnino, so ureotelične vrste živali.

Urinski sistem pri pticah ima drugačno anatomsko osnovo in funkcionalnost kot pri sesalcih. Razlika med ledvično skorjo in sredico ni jasno naznačena. Poleg renalnega obstaja tudi portalni krvni obtok, ki izhaja iz ven zadnjih okončin. Glomeruli so majhni, nefroni so dvojne vrste: tisti s Henleyjevo zanko (sesalskega tipa) in tisti brez nje (plazilskega tipa). Ledvice ptic nimajo ledvične čaše, uretri prodirajo globoko v parenhim. Obloženi so z enoslojnim, prizmatičnim epitelom, ki vsebuje sluzne celice, ki proizvajajo veliko sluzi. Sečevoda ne iztekata v mehur, pač pa neposredno v kloako. Ker je končni produkt metabolizma proteinov sečna kislina, ta vstopa v sečevode in se zaradi slabe topnosti kristalizira. Sluz iz sečevodov ovije kristalčke in preprečuje poškodbe tkiva. Reabsorpcija vode iz kloake nadomešča slabo reabsorpcijo v tubulih.

Posebnosti termoregulacije

Kokoši imajo kakor druge ptice višjo fiziološko telesno temperaturo (39–41 °C) kot placentarni sesalci (38±2 °C). Pri povišani telesni temperaturi oddajajo toploto s povečanjem telesne površine (odmikanjem kril), umikanjem v senco ali s pospešenim dihanjem. Pri posebno visokih temperaturah kokoš odpre kljun in s krčenjem grlnih mišic pospeši plitko dihanje, ki ima namen povečati izhlapevanje iz zgornjih področij dihal. S tem se sluznica na tem področju ohlaja in ohlajena kri se vrača v telo.

Posebnosti endokrinega sistema

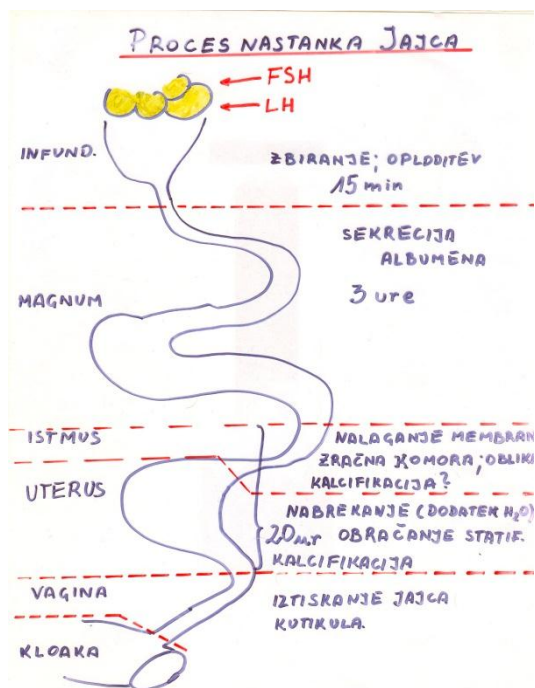
V **nevrohipofizi** se izločata 8-arginin-vazotocin (AVT) in mezotocin (MT). AVT ima vazopresinski, adiuretični in oksitocinski učinek. Vloga MT ni popolnoma jasna, najverjetneje ima diuretični učinek.

Režnja **ščitnice** sta med seboj popolnoma ločena in ležita v prsni votlini. Pri sesalcih je **nadledvična žleza** histološko razdeljena na skorjo in sredico, pri pticah pa sta sredica in skorja pomešani in ločitev ni jasna.

Nastanek jajca

Jajce je oplojena ali neoplojena jajčna celica ptic ali perutnine z rezervnimi hranljivimi snovmi. Reproductivni organi perutnine, v katerih jajce nastaja, so sestavljeni iz levega jajčnika in levega jajcevoda. Glavne sestavine jajca so: jajčna lupina, beljak, rumenjaki. Beljak predstavlja 55 do 60, rumenjaki 30 do 35, jajčna lupina pa 9 do 11 odstotkov skupne mase jajca.

Proces tvorjenja jajca se prične v jetrih, kjer lipidne sestavine jajčnega rumenjaka nastajajo pod vplivom estrogenov. Od tam potujejo v jajčnik, kjer se slojevito nalagajo okoli jajčne celice. Po ovulaciji preide jajčna celica z rumenjaki v del jajcevoda, imenovan **infundibulum** (lijak). Tu pride do oploditve, jajce pa se tu zadržuje le okoli 15 minut. V naslednjem predelu, imenovanem **magnum** (velik), se jajce zadržuje približno 3 ure. Žleze v stenah izločajo beljakovine, ki se naberejo okoli rumenjaka in so osnova beljaka. Tvorba nato preide v **istmus** (zožitev), kjer se nanjo naložita obe keratinski opni. V tem delu pride do obračanja jajca in nastanka značilne oblike. Pri kirurški odstranitvi istmusa je jajce okroglo. Verjetno se tu prične tudi prva poapnitev jajčne lupine. V **uterusu** (maternici) se jajce zadržuje okoli 20 ur. V prvih 5 urah pričnejo žleze v steni izločati vodeno tekočino, zaradi katere beljakovine močno nabreknejo in jajce pridobi na velikosti. Dodajanje vode in obračanje jajca povzroči plastovitost beljaka. Tvorita se tudi halazi. V naslednjih petih urah se intenzivno, kasneje pa počasneje, nalaga apnenčasta lupina z izločanjem kalcija in bikarbonatov. Kalcij izločajo epitelne, bikarbonatne ione pa cevaste žleze, ki leže pod epitelijem. Obe sestavini tvorita na površini keratinske opne lupino iz kalcijevega bikarbonata. V uterusu se izloča tudi barvilo, ki obarva jajce, potem ko je lupina že izoblikovana. Nastalo jajce preide skozi **vagino** (nožnico) v kloako, od tam pa v zunanji svet. Pri prehodu skozi vagino se obda s tanko prevleko ali kutikulo, ki prekrije pore v jajčni lupini in preprečuje vdor bakterij v notranjost jajca.



Slika 1: Nastanek jajca pri kokoši.

Preglednica 3: Nekateri hematološki parametri pri domačih živalih.

Parameter	Prašč	Ovca	Kokoš	Pes	Mačka
krvni volumen [ml/kg]	50–90	60–75	78–92	72–74	65–70
hemoglobin [g/100 ml]	130 (100–160)	115 (90–150)	110 (100–140)	150 (120–180)	120 (80–150)
hematokrit [%]	0,42 (0,34–0,50)	0,37 (0,29–0,45)	0,32 (0,27–0,51)	0,46 (0,35–0,56)	0,37 (0,42–0,45)
št. eritrocitov [n . 10 ¹² /L]	7,0 (5,0–8,0)	10,0 (6–13)	2,8 (2,5–3,2)	6,0 (5,5–8)	7,0 (6–10)
premer eritrocitov [μm]	6	4,8	12 x 7,5	7,2	6,1
površina eritrocita [μm ²]	113	66	183		
skupna površina eritrocitov [m ²]	2323	6328	88	do 1300	pribl. 190
MCV [fl]	53–66	30–44	115–125	59–70	51– 63
MCH [pg]	19,0	10,0		22,8	
MCHC [g/L]	320	325		340	
sedimentacija [mm/h]	5,0	0,6	4,0	2,0	7,3
št. levkocitov [n . 10 ⁹ /L]	16 (11–22)	8 (4–10)	26 (10–35)	12 (8–18)	12 (5–19)
% nevtrofilcev	35–50	25–35	25–30	60–70	55–60
% limfocitov	50–55	60–65	55–60	20–25	30–35
% eozinofilcev	2–5	2–5	3–8	2–5	2–5
% bazofilcev	1	1	1–4	1	1
% monocitov	5	5	10	5	5
št. trombocitov [n . 10 ⁹ /L]	150–500	170–980	190–410	200–600	170–370

LITERATURA

1. Cunningham JG. Textbook of veterinary physiology. Philadelphia: Saunders, 2002.
2. Swenson MJ. Dukes' physiology of domestic animals. Ithaca: Cornell University Press, 2004.
3. Cestnik V. Fiziologija domačih živali: uvod, splošna fiziologija, fiziologija krvi. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 1993.
4. Cestnik V. Fiziologija prebave pri domačih živali. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 1994.
5. Cestnik V. Metabolizem pri domačih živalih. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 1995.
6. Cestnik V. Fiziologija krvnega obtoka, dihanja, izločanja, urejanja pH in termoregulacije pri domačih živalih. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 1995.
7. Cestnik V. Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 1996.

UVOD

Za uspešno delo z laboratorijskimi živalmi je potrebno standardizirati pogoje v okolju, kjer redimo laboratorijske živali ali izvajamo poskuse. Živali, ki jih uporabljamo, morajo imeti točno opredeljene genetske lastnosti, biti morajo brez parazitov in ne smejo biti okužene s patogenimi mikroorganizmi. Standardizirana in v znanstvenih objavah jasno opisana prehrana živali v reji in poskusih je dodatna zahteva, ki zagotavlja točnost in zanesljivost rezultatov ter ponovljivost opravljenih poskusov.

Zakovitosti prehrane laboratorijskih živali se v osnovah ne razlikujejo od zakonitosti prehrane drugih živalskih vrst in človeka. Namen, za katerega jih redimo, pa daje njihovi prehrani posebne značilnosti in postavlja posebne zahteve. Domače živali redimo zato, da pridobimo hrano posebne kakovosti za človeka. Obrok za te živali pripravimo na osnovi fizioloških in poudarjeno tudi ekonomskih zakonitosti. Pri delu z laboratorijskimi živalmi pa krmo pripravimo po njihovih fizioloških potrebah. Te potrebe so za različne vrste in kategorije laboratorijskih živali natančno dorečene in različne. Krma mora biti sestavljena tako, da so pokrite vse potrebe po hranljivih snoveh, neodvisno od tega, kje in kdaj v svetu živali za poskuse redimo ali opravljamo poskuse. V reji in pri delu z laboratorijskimi živalmi moramo upoštevati tudi etične vidike.

S pravilno prehrano moramo v organizmu živali doseči ravnotežje v prebavi in presnovi energije ter vseh hranljivih snovi. To ravnotežje zagotavlja zanesljivost in točnost opravljenih poskusov. Laboratorijske živali ali njihove organe uporabljamo kot »merilne instrumente« v bioloških poskusih. Doseženo ravnotežje v presnovi organizma poskusne živali predstavlja »umeritev instrumenta«, standardizira odzivnost živali na vplive, ki jim je izpostavljena v okolju in v poskusih. Pri tem se moramo zavedati, da prehrana živali ni pomembna samo v času, ko izvajamo poskuse. Prehrana poskusne živali skozi celo njeno življenje, tudi že pred začetkom poskusa, vpliva na njeno oskrbljenost s hranljivimi snovmi in s tem na ravnotežje v presnovi organizma v času poskusa. Napake v prehrani v času pred poskusom in med poskusom ne zagotavljajo zanesljivih rezultatov. Pri laboratorijskih živalih je eden izmed ciljev reje uravnotežena prehrana skozi celotno življenjsko obdobje ne glede na to, ali bomo živali uporabili v poskusne namene ali ne.

HRANLJIVE SNOVI

Hranljive snovi oziroma metaboliti, ki iz njih nastajajo v procesih prebave in presnove, se v organizmu porabljajo kot energetske snovi (ogljikovi hidrati, maščobe, odvečne beljakovine, hlapne maščobne kisline), strukturne snovi (beljakovine, maščobe, kalcij, fosfor, magnezij in voda) ter kot učinkovine (rudninske snovi, vitamini). Različne snovi imajo različno energijsko vrednost. Te vrednosti v oceni energijske vrednosti krme seštevamo in tako ocenimo energijsko vrednost krmila. Poznamo potrebe živali po energiji in po posameznih hranljivih snoveh.

Klasična delitev hranljivih snovi po kemično določenih skupinah (beljakovine, ogljikovi hidrati, maščobe, rudninske snovi in vitamini) ter določanje potreb živali na tej osnovi že v reji domačih živali ne zadostujeta več. Danes poznamo pomen posameznih metabolitov, ki jih iz zaužite krme oz. hranljivih snovi v njej živali dobivajo in absorbirajo iz prebavil, zato določamo potrebe po le-teh. Hranljive snovi, ki jih vsebujejo krmila, v sodobni prehrani niso sestavljene organske snovi ali soli anorganskih elementov, pač pa so enostavne molekule ali elementi, ki se lahko prebavijo in absorbirajo iz prebavil ter so v presnovi potrebne kot vir energije, strukturna snov ali učinkovina. Organizem ne potrebuje beljakovin, potrebuje aminokisline, še posebej esencialne aminokisline. Beljakovine, ki so sestavljene iz aminokislin, se v prebavilih prebavijo do aminokislin. Podobno velja za sestavljene ogljikove hidrate (sladkorje, škrob), saj telo potrebuje monosaharide in hlapne maščobne kisline, ki jih iz ogljikovih hidratov v krmi pridobi v procesih kemijske in mikrobne prebave. Tudi pri maščobah so

za organizem pomembne posamezne maščobne kisline in ne skupna količina zaužitih maščob. Kuhinjska sol (NaCl) je vir natrija in klor. Tudi druge natrijeve spojine so vir natrija. Enako velja za soli drugih anorganskih elementov oziroma za druge rudninske snovi. Različne kemične oblike nekega elementa (anorganske soli ali elementi, vezani v organskih spojinah) so različno izkoristljive v prebavi in v presnovi. Vitamini in provitamini so hranljive snovi v krmi, ki jih organizem lahko neposredno prebavi in v presnovi pretvori v aktivne oblike.

Odstopanje od tega pravila predstavljajo snovi iz skupine surovih vlaknin (celuloza, hemiceluloze, pektini, lignin). Njihova hranilna vrednost je povezana z mikrobno prebavo v prebavilih in poudarjeno vpliva tudi na fizikalne lastnosti krme in s temi lastnostmi povezanim delovanjem prebavil (mehanična prebava, lastnosti blata), zato so pomembna hranljiva snov kot kompleksne molekule in ne toliko kot snovi (metaboliti), ki nastanejo v procesih prebave in presnove. V pravih količinah in ob pravilni sestavi omogočajo normalno prebavo vseh hranljivih snovi.

Posebno mesto med hranljivimi snovmi ima voda. Voda je celo najpomembnejša hranljiva snov. Njeno pomanjkanje najhitreje prizadene vse funkcije presnove in preživitveno sposobnost organizma, saj živali ob pomanjkanju vode zaužijejo tudi premalo krme.

Živali in človek potrebujejo v svoji prehrani okrog 100 različnih natančno definiranih hranljivih snovi. Te snovi morajo živali dobiti s krmo, ki jo zaužijajo. Različne vrste krme (krmil) vsebujejo različne količine različnih hranljivih snovi in energije. Različna krmila zato v različnih količinah združujemo v obrok, ki ga živali v določenem obdobju lahko pojedjo. Sestavljamo dnevni obrok, ki je osnova standardizacije prehrane. V prehrani laboratorijskih živali iz različnih krmil pripravljamo sestavljene krmne mešanice (krmila). Dnevno zaužita sestavljena krmna mešanica predstavlja obrok za laboratorijske živali.

V strokovni literaturi so v preglednicah navedene potrebe živali po posameznih hranljivih snoveh v kilogramu pripravljene krmne mešanice in potrebne koncentracije hranljivih snovi in energije v dnevnem obroku za različne vrste in kategorije živali. Danes poznamo in moramo pri laboratorijskih živalih upoštevati potrebe po energiji in po približno 50 hranljivih snoveh. Pri tem je premalo samo vedenje o vsebnosti energije in posameznih snovi v krmi. Vedeti moramo, kako se te energetske in strukturne snovi ter učinkovine lahko izkoriščajo iz prebavil. Poznati moramo njihovo prebavljivost. Vedeti moramo, kako se prebavljene in v kri ali limfo absorbirane hranljive snovi izkoriščajo v presnovi. Tudi v kri ali limfo absorbirani različni produkti prebave v presnovi niso enakovredno izkoristljivi. Poznati moramo tudi njihovo presnovljivost oz. celovito izkoristljivost (availability). Prebavljivost in presnovljivost hranljivih snovi sta osnovi za določitev potreb živali po energiji in hranljivih snoveh ter za ustrezno sestavo krmnih mešanic. V predpisanih normativih je navedena potrebna energetska vrednost popolnih krmnih mešanic, potrebna količina prebavljivih surovih beljakovin in surovih vlaknin ter potrebna količina vsake od esencialnih hranljivih snovi v krmnih mešanicah. Esencialne hranljive snovi so snovi, ki jih organizem mora dobiti s krmo, ker jih sam v svoji presnovi ne more sintetizirati, brez njih pa življenje ni možno. Tudi voda sodi med esencialne hranljive snovi.

POTREBE LABORATORIJSKIH ŽIVALI PO ENERGIJI IN HRANLJIVIH SNOVEH

V različnih znanstvenih in strokovnih objavah so navedene potrebe laboratorijskih živali po energiji in hranljivih snoveh. Potrebe so navedene v količinah, ki jih različne vrste in kategorije živali potrebujejo na dan. Ker vemo, koliko suhe snovi obroka z določeno koncentracijo energije lahko živali pojedjo na dan, so ti normativi preračunani v potrebno koncentracijo hranljivih snovi v krmni mešanici (Preglednica 1).

POSLEDICE NEUSTREZNE OSKRBE ŽIVALI S HRANLJIVIMI SNOVMI

Kot neustrezno opisujemo po eni strani nezadostno oskrbo (**premalo**), po drugi strani pa preobilno (**preveč**) oskrbo z vsako od hranljivih snovi ali z energijo. Vemo pa, da v prebavi, presnovi in izločanju obstajajo značilne povezave med hranljivimi snovmi. Ena hranljiva snov lahko ovira ali pospešuje prebavo, nalaganje ali izkoriščanje telesnih rezerv, izkoriščanje v presnovi ali izločanje druge hranljive snovi ali več teh snovi. Zato tudi **neustrezna razmerja** med hranljivimi snovmi v obroku motijo ravnotežje v presnovi. V strokovni literaturi so navedeni normativi o zahtevanih fizioloških razmerjih med posameznimi hranljivimi snovmi v obroku. Med temi posebej poudarjamo koncentracijo energije v odnosu do vseh drugih snovi v obroku. Koncentracija energije odloča o količini krme, ki jo bo žival zaužila. Krmila z večjo koncentracijo energije bo žival pojedla manj (prej bo pokrila svoje potrebe po energiji) kot krmila z manjšo koncentracijo energije. Koncentracijo vseh ostalih hranljivih snovi v krmni mešanici moramo zato prilagoditi koncentraciji energije v njej. Ob večji koncentraciji energije v krmilu je v njem malo strukturnih, prehranskih vlaknin, kar moti procese prebave. Tudi razmerja med posameznimi rudninskimi snovmi (Ca : P; Ca : Zn; Na : K; Fe : Cu itd.) so v obrokih zelo pomembna.

Preglednica 1: Priporočene vrednosti za vsebnost energije in hranljivih snovi v pripravljenih popolnih krmnih mešanicah za nekatere laboratorijske živali v času rasti (izraženo na kg krmne mešanice, ki vsebuje 90 odstotkov suhe snovi) (prirejeno po Beynen in Coates, 2001).

	MIŠI	PODGANE	KUNCI
Prebavljiva energija* (kJ/g)	16,8	16,0	10,5
Maščobe (g/kg)	50	50	20
Surove vlaknine (g/kg)	pn ^p **	pn ^p **	110
Beljakovine (g/kg)	180	150	160
Aminokisline			
Arginin (g/kg)	3	4,3	6
Asparagin (g/kg)	nz	4	nz
Glutaminska kislina (g/kg)	nz	40	nz
Histidin (g/kg)	2	2,8	3
Izolevcin (g/kg)	4	6,2	6
Levcin (g/kg)	7	10,7	11
Lizin (g/kg)	4	9,2	6,5
Metionin + Cistin (g/kg)	5	9,8	6
Fenilalanin + Tirozin (g/kg)	7,6	10,2	11
Prolin (g/kg)	nz	4	nz
Treanin (g/kg)	4	6,2	6
Triptofan (g/kg)	1	20,0	2
Valin (g/kg)	5	7,4	7
Glicin (g/kg)	nz	nz	nz
Makro in mikro-minerali			
Kalcij (g/kg)	5	5	4
Klor (g/kg)	0,5	0,5	3
Magnezij (g/kg)	0,5	0,5	0,35
Fosfor (g/kg)	3	3	2,2
Kalij (g/kg)	2	3,6	6
Natrij (g/kg)	0,5	0,5	2
Žveplo (g/kg)	nz	pn ^p	nz
Krom (mg/kg)	2	pn ^p	nz
Baker (mg/kg)	6	5	3
Flor (mg/kg)	nz	pn ^p	nz
Jod (mg/kg)	0,15	0,15	0,2
Železo (mg/kg)	35	35	pn ^p
Selen (mg/kg)	0,15	0,15	pn ^p
Cink (mg/kg)	10	12	pn ^p

Vitamini			
Retinol – provitamin vitamina A (mg/kg)	0,15	1,2	0,17
Holekalciferol – vitamin D (mg/kg)	4	25	pnp
DL- α -tokoferil acetate – vitamin E (mg/kg)	32	27	40
Menadion – vitamin K (mg/kg)	1	1	pnp
Tiamin – vitamin B ₁ (mg/kg)	5	4	pnp
Riboflavin – vitamin B ₂ (mg/kg)	7	3	nz
Nikotinska kislina – vitamin B ₃ (mg/kg)	15	15	180
Pantotenska kislina – vitamin B ₅ (mg/kg)	16	10	nz
Piridoksin – vitamin B ₆ (mg/kg)	8	6	39
Folna kislina – vitamin B ₉ (mg/kg)	0,5	1	nz
Cianokobalamin – vitamin B ₁₂ (μ g/kg)	10	50	np
Biotin – vitamin H (mg/kg)	0,2	0,2	pnp
Holin (mg/kg)	2000	750	1200
Inozitol (mg/kg)	pnp	np	nz
Askorbinska kislina – vitamin C (mg/kg)	np	np	np

* Metabolna ali presnovljiva energija predstavlja 90–95 odstotkov prebavljive energije

** Navadno 50 g/kg krmne mešanice

pnp – potrebno, vendar potrebe niso poznane; nz – ni poznano; np – ni potrebno

Posledice neustrezne oskrbe laboratorijskih živali s hranljivimi snovmi v obdobju vzreje so: slabša rast mladih živali, spremenjena kakovost (sestava) prirasta, manjša mlečnost samic, spremenjena sestava mleka, spremembe v kondiciji in telesnih rezervah pri odraslih živalih, spremembe v odzivnosti živali na dražljaje iz okolja, spremembe v obnašanju živali, motnje v plodnosti, zdravstvene motnje in krajša življenjska doba. V vzreji nepravilno krmljene živali niso primerne za poskuse. Napake v prehrani živali v poskusih pa ne omogočajo točnosti, zanesljivosti in ponovljivosti poskusov.

Kljub temu da se ob krmljenju ustrezno sestavljene na trgu dostopne krmne mešanice za laboratorijske živali navadno ne srečujemo z boleznimi, ki so posledica napak v prehrani, te bolezni opisujejo pomen prehrane tudi v reji laboratorijskih živali. Pojavljajo se kot: prebavne motnje, presnovne bolezni, deficitarne bolezni, hipovitaminoze, degenerativni procesi na jetrih in ledvicah, kardiovaskularna obolenja, bolezni okostja, zob in kože, nespecifične bolezni zaradi prizadete obrambne sposobnosti organizma, motnje v plodnosti, slabša vitalnost novorojenih živali in pogin živali v reji ali poskusu. Alergije in zastrupitve, teratogeni in kancerogeni učinki napačne prehrane so v največji meri povezani z vsebnostjo škodljivih snovi v krmi.

Neposredna, klinično zaznavna obolenja, ki jih naštevamo, niti niso tako pomembna. Pomembno je dejstvo, da že subklinične motnje, ki so posledica manjših ali kratkotrajnih napak v prehrani, za organizem pomenijo obremenitev, motnjo v presnovnem ravnotežju in spremenjeno odzivnost na pogoje, ki so jim izpostavljeni v reji in poskusih. Dodatna obremenitev in stres ob izvajanju poskusov lahko izzove klinični pojav bolezni.

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA POTREBE ŽIVALI PO HRANLJIVIH SNOVEH IN ENERGIJI

Vrsta živali

Različne živalske vrste, ki jih redimo kot laboratorijske živali, imajo anatomsko in fiziološko različno zgrajena prebavila, različno intenzivnost razmnoževanja in rasti, različno odraslo velikost in različno intenzivne aktivnosti v dnevnem ritmu. Zato je logično, da imajo različne vrste laboratorijskih živali različne potrebe po hranljivih snoveh in energiji.

Življenjska obdobja

Mlade, rastoče živali imajo večje potrebe (za rast) kot odrasle živali, ki potrebujejo hranljive snovi in energijo samo za vzdrževanje. Krma za mlade živali bi morala biti drugače sestavljena (normativi to predpisujejo) kot krma za odrasle živali. Posebne (večje) zahteve imajo breje samice in samice v laktaciji. Tudi za ti dve kategoriji poznamo pri posameznih vrstah živali posebne normative.

Spol

Prirast pri živalih moškega spola in sestava telesa pri odraslih samcih sta drugačna kot pri samicah. Temu bi morali prilagajati tudi prehrano oziroma sestavo krmnih mešanic. V praksi tega še ne upoštevamo.

Genetski dejavniki

Znotraj ene vrste laboratorijskih živali redimo linije z različnimi genetskimi lastnostmi. Pri tem nista toliko pomembni različna hitrost razvoja (dozorevanja) in odrasla velikost, kot so genetske razlike v presnovi. Za linije z znanimi odstopanji v genetskih lastnostih (mutanti, transgene živali) je predpisana posebna sestava krmnih mešanic.

Okoljski dejavniki

Na intenzivnost presnove in s tem na potrebe živali po hranljivih snoveh in energiji vplivata temperatura in vlaga v okolju. Tudi intenzivnost in trajanje dnevne osvetlitve spreminjata presnovo in potrebe živali. Živali se temu prilagajajo tako, da pojedjo manj ali več krme. Škodljive primesi v zraku (prah, amonijak) in neustrezna higiena nastila prav tako motita zauživanje krme in presnovo v organizmu. Pogoji v okolju so v reji laboratorijskih živali in poskusih natančno predpisani. Odstopanja od predpisanih vrednosti povzročajo spremembe v prebavi in presnovi. Nekateri raziskovalci upoštevajo tudi vpliv koprofagije pri glodavcih na potrebe po vitaminih skupine B v krmi. Ob reji miši in podgan v kletkah z rešetkastim dnom je koprofagija omejena, zato bi moralo biti v krmni mešanici več vitaminov skupine B.

Mikrobni status

Mikroorganizmi v prebavilih aktivno sodelujejo v procesih prebave in vzpostavljanju obrambnih sposobnosti organizma. V reji gnotobiotičnih živali (akseničnih živali ali »germ free« živali in živali s poznano in definirano mikrobno populacijo v prebavilih ali asociiranih živali) je potrebno krmne mešanice temu prilagoditi. Vsebovati morajo lahko prebavljive vire aminokislin in energije ter dodatne količine vitaminov skupine B. Z ustreznim dodatkom celuloze zagotovimo, da prehod krme skozi prebavila ne bo prehiter in da bo blato za vrsto živali primerno oblikovano. SPF (Specific Pathogen Free) in COBS (Caesarean Obtained, Barrier Sustained) kategoriji nimata posebnih dodatnih zahtev v primerjavi s konvencionalnimi živalmi. Neustrezna higiena v okolju in higiena krme spreminjata naseljenost prebavil z mikroorganizmi, kar spreminja procese prebave, lahko pa povzroča tudi različna bolezenska stanja v prebavilih.

Dejavnik »raziskava«

Vsak poskus predstavlja za živali določeno spremembo v okolju in postopkih dela z živalmi, določen stres. Pričakujemo, da se bodo živali v poskusu odzvale v skladu s hipotezami raziskave, ki lahko vključujejo tudi spremembe v presnovi ob »normalni« prehrani. Prvi odziv na stres, posebej če je povezan s posegom na živali, je navadno izražen z manjšim zauživanjem krme. Tako stanje potem ni več »normalna« prehrana. Zato moramo med poskusi redno spremljati količine krme, ki jo živali pojedjo (konzumacijo), in vpliv na konzumacijo upoštevati v rezultatih raziskave.

KONZUMACIJA KRME

Laboratorijske živali imajo zelo veliko konzumacijsko sposobnost. Ta je odvisna od vrste živali, velikosti živali, od njihovih potreb (rast, brejost, laktacija), od pogojev v okolju (temperatura in vlaga v okolju) in od lastnosti krme. Manjše živali pojedjo na kg telesne mase več suhe snovi krme kot večje. Živali v času rasti in v brejosti ali laktaciji pojedjo več suhe snovi na kg telesne mase kot odrasle živali, ki jih redimo samo na ravni vzdrževalnih potreb. Največji vpliv na konzumacijo ima pri laboratorijskih živalih koncentracija energije v obroku (krmni mešanici). Navadno kilogram krmne mešanice za laboratorijske živali vsebuje 17,0–19,0 MJ bruto energije (BE), 15,3–18,0 MJ prebavljive energije (PE) ali 13,8–17,1 MJ metabolne ali presnovljive energije (ME). Koncentracija energije v krmni mešanici je v največji meri odvisna od vsebnosti maščob in (ali) surovih vlaknin v njej. Konzumacija energije ostaja npr. pri podganah konstantna, če je v krmni mešanici od 10 do 30 odstotkov maščob. Ob manjši koncentraciji energije pa bodo živali lahko pojedle do 50 odstotkov več krmne mešanice, da bodo pokrile svoje potrebe. Če pa je koncentracija energije zmanjšana zaradi prevelike koncentracije surovih vlaknin v krmi, je konzumacija zmanjšana zaradi slabe prebavljivosti take krme. Z večjo konzumacijo se laboratorijske živali prilagajajo tudi pomanjkanju beljakovin v obroku. Pomanjkanje esencialnih aminokislin vodi do manjše konzumacije krme. Pomanjkanje (tudi zaradi povečanih potreb) rudninskih snovi in vitaminov v obroku vodi do zmanjšane konzumacije krme. To zmanjšujejo tudi neugodni pogoji v okolju in stres. Nižje temperature v okolju konzumacijo povečajo, višje temperature pa zmanjšajo. Ob pomanjkanju vode žejne živali pojedjo manj krme ali sploh ne jedo.

Ob teh različnih vplivih in res veliki variabilnosti v strokovni literaturi ni navedenih zanesljivih podatkov o tem, koliko suhe snovi obroka lahko pojedjo posamezne vrste in kategorije laboratorijskih živali. Vsak rejec laboratorijskih živali ali izvajalec poskusov mora za svoje živali ugotavljati, koliko krme pojedjo. Brez podatka o vrsti, kakovosti krmne mešanice ali krmil in količini zaužite krme so rezultati poskusov pomanjkljivo opisani. S spremljanjem konzumacije lahko ugotavljamo razlike med kontrolno skupino in poskusnimi skupinami.

V poskusih, ki jih opravljamo v okviru Katedre za prehrano Oddelka za zootehniko, smo ugotovili, da odrasle laboratorijske miši soja NMRI (25–27 g telesne mase) v povprečju pojedjo okrog 5 g standardne krmne mešanice (Knapka) na dan, kar pomeni približno 18 odstotkov od telesne mase. Breje miške ob vzporedni laktaciji na dan pojedjo tudi do 15 g krmne mešanice (okrog 50 odstotkov od telesne mase). Mlade laboratorijske podgane soja Wistar, s telesno maso okrog 100 g, pojedjo v povprečju 16 g testne poltekoče krmne mešanice na dan, kar je v suhi snovi približno 9 odstotkov telesne mase. V preglednici 2 so okvirne vrednosti o količinah zaužite krme za največkrat uporabljene laboratorijske živali.

Preglednica 2: Povprečna konzumacija krme (g/dan) (Ritskes - Hoitinga in Chwalibog, 2003).

	Mlade (rastoče)	Odrasli	Breje samice	Samice v laktaciji
Miši	3–5	5–7	6–8	7–15
Podgane	8–25	25–30	25–35	35–65
Kunci	120–200	200–300	300	300–400

SESTAVLJENE KRMNE MEŠANICE

Klasične krmne mešanice, ki so v prehrani laboratorijskih živali najpogostejše, so sestavljene iz surovin rastlinskega izvora (zrna žit, stročnic in oljnih rastlin), stranskih proizvodov mlinarske industrije (otrobi, krmilne moke) in oljne industrije (tropine in pogače), dehidriranih zelenih rastlin ter surovin živalskega izvora (mleko v prahu, ribja moka itd.), anorganskih soli ali organskih spojin različnih rudninskih snovi in z ekstrakcijo, biotehnološko ali kemično pridobljenih vitaminov.

Če so krmne mešanice v deklaraciji proizvajalca opredeljene samo po hranilni vrednosti, vsebnosti energije in posameznih hranljivih snovi = **zaprtá receptura** = **natural ingredient diets**, njihova sestava navadno ne ustreza zahtevam standardizacije. Sestavljene so lahko iz različnih vrst surovin, ki

po količini zagotavljajo predpisano vsebnost hranljivih snovi in energije v njih. Različne vrste surovin pa vsebujejo posamezne hranljive snovi različne kakovosti, ki se v organizmu živali različno izkoriščajo. Zato za prehrano laboratorijskih živali v mešalnicah danes proizvajajo krmne mešanice s predpisano surovinsko sestavo. Po celem svetu uporabljamo krmne mešanice, sestavljene iz enakih deležev določenih sestavin (**odprta receptura = fixed formula diets**). Ker pa na lastnosti surovin, iz katerih sestavljamo krmne mešanice, vplivajo pogoji, v katerih jih pridelujemo in pridobivamo, tudi te vrste krmnih mešanic ne zagotavljajo popolne primerljivosti ali ponovljivosti rezultatov poskusov. Niso dovolj standardizirane. To lahko dosežemo, če pripravimo t. i. **čiste diete (purified diets)**, sestavljene iz kemično čim bolj definiranih snovi. Uporabljamo kazein, čiste sojine beljakovine, škrob in druge sladkorje, definirane po poreklu, celulozo, definirano rastlinsko olje ali živalske maščobe ter kemično čiste anorganske soli in vitamine. Posebno vrsto krmnih mešanic, ki še bolj izpolnjujejo pogoje standardiziranosti, predstavljajo t. i. **kemično definirane diete (chemically defined diets)**, ki so sestavljene iz čistih hranljivih snovi (metabolitov): aminokislin, maščobnih kislin, specifičnih ogljikovih hidratov in analitsko čistih soli anorganskih spojin ter vitaminov. Za določene vrste poskusov lahko po naročilu uporabnika pripravljamo **posebne krmne mešanice**, ki ustrezajo zahtevam raziskav (npr.: krmne mešanice s pomanjkanjem ali prebitkom določenih hranljivih snovi).

Kljub temu da smo navedli celo vrsto vplivov, ki spreminjajo potrebe živali in zahtevajo različno sestavljene krmne mešanice, danes na trgu – in še posebej v Sloveniji – vse potrebne variante niso dostopne. Za miši in podgane v reji navadno uporabljamo samo eno vrsto krme. Predpostavljamo, da bodo živali različne vrste in kategorije znotraj vrste s svojimi homeostatskimi mehanizmi zagotovile zadovoljivo ravnotežje v presnovi.

Poleg predpisane sestave krmnih mešanic za posamezne vrste in kategorije laboratorijskih živali je predpisano tudi, česa te mešanice ne smejo vsebovati: pesticidov, herbicidov, insekticidov, insektov, plesni, bakterij, bakterijskih toksinov, mikotoksinov, naravnih rastlinskih toksinov, hormonomimetičnih snovi, razgradnih produktov hranljivih snovi (gnilobnih produktov, peroksidov), nitratov, nitritov, nitrozaminov in težkih kovin. Proizvajalci morajo zagotavljati odsotnost okrog 40 različnih kontaminantov v krmnih mešanicah.

Navadno uporabljamo krmne mešanice za laboratorijske živali v **peletirani** obliki, redkeje v **briketirani** ali **ekstrudirani** obliki. V teh krmnih mešanicah je dovoljena vsebnost vode na ravni pod 12 odstotki. Pri večji vsebnosti vode se krmilo kvari. Že sam postopek priprave (temperatura) zagotavlja odsotnost mikroorganizmov v krmnih mešanicah. Za rejo akseničnih in laboratorijskih živali SPF kategorij v mešalnicah krmne mešanice razkužujejo z avtoklaviranjem ali obsevanjem. Klasično pripravljenih krmnih mešanic ne smemo avtoklavirati sami, saj ob segrevanju v mešanici propadajo vitamini in prihaja do oksidacije maščob.

Proizvajalec mora zagotoviti tudi ustrezne fizikalne lastnosti peletirane, briketirane ali ekstrudirane krmne mešanice. Preveč drobljivi peleti niso primerni, ker se ob tem povečuje raztros, glodavci pa ob zauživanju take krme ne obrabljajo zob. Pretrdi peleti – še posebej pri mladičih – onemogočajo zauživanje zadostnih količin krme. Barva in vonj krmne mešanice sta značilno povezana z njeno sestavo in tudi s kakovostjo. Od ene do druge dobave istega proizvajalca se ne smeta spreminjati. Kvarjenje krme povzroča spremembe v barvi in vonju.

Krmne mešanice v **obliki moke** uporabljamo takrat, ko želimo v mešanico nekaj dodati in proučevati učinek tega dodatka. Krmna mešanica z dodatkom mora biti homogena zmešana. Največkrat mešanici v obliki moke dodamo določeno količino vode in krmimo t. i. tekočo ali poltekočo krmo. Seveda je dodajanje vode potrebno opravljati za vsako krmljenje posebej, drugače se mokra krma hitro pokvari (plesen). Tako obliko krme lahko uporabljamo le pri kratkotrajnih poskusih, v reji pa ne.

Nekaterim vrstam laboratorijskih živali v komercialni reji (morski prašički, mongolski skakači) ob krmnih mešanicah dodajamo tudi zelenjavo, korenje, peso ali različne vrste zrn. Ustrezna kakovost teh dodatkov ne moti presnove, ugodno deluje na procese prebave in obnašanje živali. V poskusih pa to pomeni, da prehrana živali ni standardizirana. Uporaba različnih vrst samostojnih krmil (v laboratoriju

pripravljen obrok) nikoli ne zagotovi optimalne oskrbe laboratorijskih živali, čeprav so na prvi pogled živali videti čisto normalne in se tako tudi obnašajo.

Posebne zahteve so predpisane za **skladiščenje krme**. Krma se ob višjih temperaturah v okolju (nad 21 °C), posebej ob visoki relativni vlagi v zraku, hitro pokvari ne glede na sestavo. Čiste in kemično definirane diete moramo hraniti pri 4 °C. Vreče s krmno mešanico morajo biti stalno zaprte. Upoštevati je potrebno rok uporabe, ki je zapisan v deklaraciji na vsaki vreči krmila. Skladiščni prostor za krmila mora biti higiensko neoporečno vzdrževan. Logično je, da insekti in prosto živeči glodavci ali ptice ne smejo imeti dostopa do skladiščnega prostora.

KRMLJENJE

Ko redimo živali ali opravljamo poskuse z živalmi v ustrezno opremljenih kletkah, nalagamo krmo v za to pripravljene krmilnike. Tudi pri talni reji morajo živali imeti prost dostop do ustrezno pripravljenih in nameščenih krmilnikov. V krmilnikih morajo imeti živali krmo stalno na voljo. Mikroklima v kletki je drugačna kot v prostoru okoli nje. Tudi če še tako redno vzdržujemo higieno kletke (zamenjava nastila, čiščenje), se krma hitro navlaži in navzame vonja iz živalskih izločkov v stelji. Zato v krmilnike ne smemo nalagati prevelikih količin krme; le toliko, kot bi živali pojedle v dveh dneh. Kakovost krme v krmilnikih je potrebno redno kontrolirati. Pokvarjeno, mokro, plesnivo ali gnilo krmo takoj zavržemo. Ugotoviti moramo, zakaj se kvari. Če v krmilnikih zmanjka krme, to povzroča resne motnje pri živalih, čeprav tega na prvi pogled ne opazimo, lahko pa vidimo motnje v obnašanju, celo kanibalizem. Pri miših (tudi podganah) npr. enodnevno stradanje ustavi estrični cikel.

Oseba, ki je zadolžena za krmljenje živali, mora redno spremljati količino krme, ki jo živali v posamezni kletki pojedjo. To je pomembno zato, ker se ob neugodnih pogojih, ob morebitnih obolenjih ali ob nepravilno sestavljeni ali pokvarjeni krmi najprej pojavi simptom manjše konzumacije krme.

Posebno pozornost moramo posvetiti gnezdov novorojenih mladičev. Mlade miške in podgane začnejo takoj, ko se jim odprejo oči (13. dan po rojstvu), iskati krmo. Za plezanje do krmilnika so še premajhne, zato jim lahko ob gnezdo namestimo krmilnik z zdrobljeno krmo. To ugodno vpliva na razvoj njihovih prebavil in celega organizma. Učinkovitost prehrane samice v laktaciji in mladičev v času do odstavitve spremljamo tako, da mladiče ob odstavitvi stehtamo. Njihovo telesno maso primerjamo s pričakovanimi vrednostmi. Logično je, da nam tudi podatek o deležu pogina pri mladičih od rojstva do odstavitve veliko pove o pogojih v reji in prehrani.

Ne glede na to, da proizvajalec zagotavlja ustrezno sestavo in kakovost krmnih mešanic, je priporočljivo, da občasno odvezamo vzorec krme in ga posredujemo v za to usposobljeni laboratorij, ki bo po našem naročilu opravil kemijske, mikrobiološke, toksikološke ali druge, po našem mnenju potrebne analize. S tem si zagotovimo zanesljivo vedenje o prehrani živali v reji in poskusih, ki jih opravljamo.

NAPAJANJE

Napajanje je prav tako kot krmljenje, če ne še bolj, pomemben postopek v prehrani laboratorijskih živali. Stekleničke, s katerimi napajamo živali, morajo biti vedno polne vode. Vodo v njih moramo menjati redno, vsak drugi dan. Neustrezna higiena vode in steklenič se hitro pokaže z rastjo alg. Stekleničke postanejo »zelene«. Pomanjkanje vode se na živalih takoj opazi, saj prenehajo jesti krmo, so nemirne, v hujših oblikah pa prihaja do kanibalizma. Tudi če je steklenička polna, še ne pomeni, da lahko živali pijejo. Odprtina za pitje se, posebej ob trdi vodi, hitro zamaši. Ob vsaki menjavi vode je potrebno preveriti, ali voda steče iz odprtine. Curek se ob protipritisku v steklenički hitro ustavi. Če curka ni ali iz stekleničke samo kaplja, je steklenička zamašena. Seveda pa odprtina v steklenički za napajanje ne sme biti prevelika, tudi pokrov stekleničke je potrebno skrbno namestiti. Moker nastil ali

voda v kletki sta znak, da je z opremo za napajanje nekaj narobe. Če živali napajamo z avtomatskimi napajalniki ali iz koritc, je potrebno redno spremljati funkcionalnost in higieno te opreme.

Kriteriji zahtevane kakovosti vode iz vodovodnega omrežja so za laboratorijske živali enaki kriterijem za pitno vodo za ljudi. Kakovost vode je potrebno redno spremljati s predpisanimi laboratorijskimi analizami, ki jih opravljajo za to registrirani laboratoriji. Pogosto se dogaja, da zaradi napak v vodovodni napeljavi voda ni ustrezne kakovosti.

ZAKLJUČEK

Pri delu z laboratorijskimi živalmi se moramo zavedati, da pravilna prehrana poleg ostalih pogojev, ki jih moramo izpolnjevati, zagotavlja standardiziran pogoj in fiziološko optimalno odzivnost živali v reji in poskusih. Na trgu so dostopne po normativih in potrebah laboratorijskih živali sestavljene krmne mešanice. Vseeno pa mora strokovnjak, tudi skrbnik živali, poznati zakonitosti prehrane, krmljenja in napajanja laboratorijskih živali. Tako bo lahko pravilno ocenil pomen svojega dela na področju prehrane, odkrival in preprečeval možne napake ter dosegel, da bodo laboratorijske živali v poskusih zanesljiv »instrument«.

LITERATURA

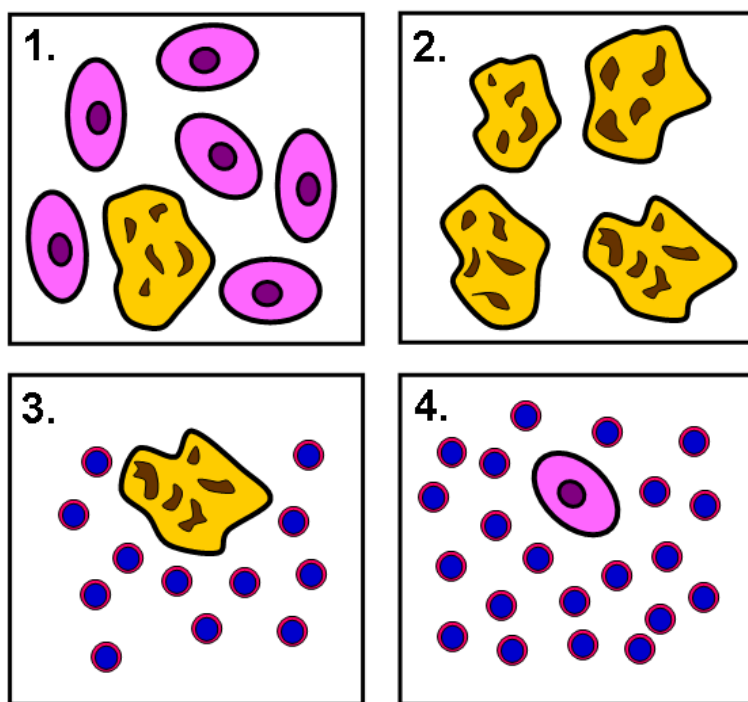
1. Beynen AC, Coates ME. Nutrition and experimental results. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of laboratory animal science: a contribution to the human use and care of animals and to the quality of experimental results. . Amsterdam, New York: Elsevier, 2001: 111–27.
2. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th revised ed. Washington: National Academy Press, 1995: 173 str.
3. Orešnik A, Kermauner A. Osnove prehrane živali: učbenik. Slovenj Gradec: Kmetijska založba, 2009: 179 str.
4. Ritskes-Hoitinga M., Chwalibog A. Nutrient requirements, experimental design, and feed schedules in animal experimentation. In: Hau J, Van Hoosier GL Jr, eds. Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices. Vol. 1. 2nd ed. Boca Raton:RC Press, 2003: 281–310.

RAZMNOŽEVANJE MIŠI

Miši so poliestrične živali, ki se pariyo skozi celo leto. Pojavni cikel pri miši traja 4 dni (lahko 5 dni). V fazi estrusa pride do sprostitve jajčeca (ovulacije) ne glede na to, ali se je miš parila ali ne (spontana ovulacija). Če gojimo v kletki skupaj več samic brez samca, pogosto vse samice preidejo v obdobje brez gonitve – anestrus. V prisotnosti samca pa feromoni, ki jih samec izloča z urinom, sprožijo ponovno vzpostavitev ciklusa in samice postanejo zopet plodne (Whittenov učinek). To lahko uporabimo za sinhronizacijo pojave pri več samicah. Samice nekaj dni gojimo skupaj brez samca, nato pa jim dodamo samca. Feromoni samca bodo povzročili ponovno vzpostavitev pojavnega ciklusa pri vseh samicah naenkrat, s čimer smo dosegli sinhronizacijo.

Fazo ciklusa lahko pri miših ugotavljamo z jemanjem brisa sramnice. Za jemanja brisa miš primemo za rep, nekoliko privzdignemo zadek in čisto predmetno steklo potegnemo po sramnici. Druga možnost pa je, da po sramnici povlečemo palčko z vato in nato bris razmažemo po predmetnem steklu. Razmaz nato pobarvamo z barvanjem po May-Grunwald-Giemsu, lahko pa tudi pogledamo neposredno pod faznokontrastnim mikroskopom za hiter pregled. V obdobju proestrusa vidimo v razmazu predvsem velike epitelijske celice in posamezne nepravilno oblikovane keratinizirane celice. V obdobju estrusa (gonitve) vidimo v razmazu večinoma velike keratinizirane celice nepravilne oblike. V obdobju medestrusa vidimo še posamezne nepravilno oblikovane keratinizirane celice in levkocite, v obdobju diestrusa pa vidimo v razmazu veliko število levkocitov, lahko pa tudi že posamezne epitelijske celice z jedrom (slika 1).

Pojavni ciklus



Slika 1: Shematski prikaz razmazov v različnih fazah pojavnega ciklusa: 1 – proestrus, 2 – estrus, 3 – medestrus, 4 – diestrus.

Spolna zrelost in brejost

Miši dosežejo spolno zrelost med 45. in 50. dnevom, vendar jih običajno pričnemo pariti okoli 60. dneva starosti, ko dosežejo tudi konstitucijsko zrelost (velikost). Miši se parijo ponavadi sredi temnega cikla dneva. Samec naskoči samico in na koncu parjenja zapre nožnico s tako imenovanim kopulatornim pokrovčkom (ang. Copulatory plug), ki je uporaben znak za ugotavljanje dneva paritve, vendar pa ni 100 % zanesljiv. Samicam, ki jim želimo določiti dan parjenja (to je pomembno pri embrioloških raziskavah, kjer moramo poznati natančno starost zarodkov), vsak dan zjutraj pregledamo nožnico in če je ponoči prišlo do parjenja, vidimo v nožnici bel trden čepek. Samice moramo pregledati čimbolj zgodaj zjutraj, saj se čepek prične raztapljati in do sredine dneva (12 ur po parjenju) običajno izgine. Drugi, bolj zahteven način ugotavljanja paritve pa je, da samicam zjutraj speremo nožnico s fiziološko raztopino in nato v izpirku s pomočjo mikroskopa ugotavljamo prisotnost semenčic.

Brejost pri miših traja v povprečju 19 dni. Miši imajo izrazit nagon graditve gnezda, zaradi česar je potrebno, da jim v kletke pred koncem brejosti dodamo kakšen material, iz katerega lahko naredijo gnezdo. Najprimernejši so kosi stisnjene celuloze, t. i. NESTLET, ki jih lahko kupimo pri podjetjih z opremo za laboratorijske živali. Lahko pa jim dodamo tudi papir ali karton, iz katerega si bodo naredile gnezdo (zelo uporabne so npr. kartonasti valji od toaletnega papirja). Povprečno število mladičev v gnezdu je od 6 do 10, so pa možna velika odstopanja od te številke (od 2 do 14 mladičev). Mladiči se rodijo slepi in goli, vendar se po rojstvu hitro razvijajo. Ob rojstvu tehtajo od 0,5 do 1,5 g. V prvih dneh po rojstvu moramo samice čim manj vznemirjati, saj vznemirjanje pogosto, sploh pri samicah s prvim gnezdom, sproži kanibalizem. Če kakšen mladič umre v prvih dneh po rojstvu ga samica navadno poje, tako da pogosto ne najdemo nobenih ostankov poginulih mladičev v gnezdu. Mladiči pridobijo imunost od matere preko posteljice še v maternici in pa z mlezivom v prvih dneh po rojstvu. Mladiče odstavljamo pri treh tednih starosti, ko so dovolj veliki, da se pričnejo sami prehranjevati (običajno začnejo jesti trdo hrano že pri dveh tednih starosti). Ob odstavitvi naj bi mladiči tehtali od 10 do 15 gramov.

Parjenje miši

Miši lahko parimo individualno ali haremsko.

Individualno pomeni, da imamo v eni kletki enega samca in eno samico. Pri individualnih parjenjih lahko samca pustimo s samico ves čas brejosti in po skotitvi mladičev. Mišji samci so običajno dobri očetje in pomagajo samici skrbeti za mladiče. Prednost takšnega načina vzreje je, da sta samec in samica ves čas skupaj. Ker se pri miših prva gonitev pojavi že prvi dan po porodu, lahko imamo naslednjo generacijo mladičev že kmalu po odstavitvi prejšnjih mladičev. Slaba stran tovrstne reje pa je, da potrebujemo za vsako samico svojega samca. Pri individualnem parjenju potekata brejost in laktacija (dojenje) istočasno. Vendar pa lahko laktacija povzroči zakasnelo vsaditev zarodkov (običajno pride do vsaditve 4. dan po oploditvi) zaradi česar se lahko podaljša čas brejosti tudi za 3 do 5 dni.

Haremsko parjenje pomeni, da imamo v kletki enega samca in 3 do največ 6 samic (običajno 3 do 4). Samec se bo paril z vsemi samicami. Pri takšnem načinu reje pa moramo običajno pred porodom breje samice odstraniti iz harema, saj je drugače zaradi velikega števila živali v kletki preveliko motenj, kar pogosto povzroči slabšo skrb za mladiče in kanibalizem. Prednost tega načina reje je, da potrebujemo le enega samca za več samic, slaba stran pa, da samice potrebujejo več časa za dve gnezdi, saj se ne zabrejijo ob poporodni gonitvi.

Pomembno je vedeti, da pri brejih miših ne smemo menjavati samca v kletkah. Če miš, brejo 4 dni ali manj, damo v kletko z novim samcem (drugim od tistega, ki jo je oplodil), bodo feromoni, izločeni z urinom povzročili zvrž, tako da se bo miš ponovno parila z novim samcem, kar imenujemo Bruceov učinek.

RAZMNOŽEVANJE PRI PODGANAH

Pojatveni cikelus

Pojatveni cikelus poteka podobno kot pri miših in traja od 4 do 5 dni, ovulacija je spontana. Prav tako kot pri miših ga lahko spremljamo s pregledovanjem brisov sramnice. Whittenov učinek pri podganah ni tako močan kot pri miših, zato za sinhronizacijo pojatve dodajamo progesteron (4 dni zaporedoma, vzpostavitev anestrusa), ki mu sledi injekcija PMSG (iz angl. pregnant mare serum gonadotropin).

Spolna zrelost in brejost

Podgane dosežejo spolno zrelost okoli 50. dneva, konstitucijsko pa še nekoliko kasneje kot miši – okoli 70. dneva, ko lahko začnemo s parjenjem. Brejost traja povprečno 21 dni (od 20 do 23 dni), povržejo pa povprečno od 6 do 10 mladičev, ki so slepi in goli, ob rojstvu pa težki okoli 5 g. Mladiče odstavljamo pri starosti 21 dni, ko morajo tehtati od 40 do 50 g. Tudi pri podgani se ob parjenju samce naredi kopulturni pokrovček, ki pa običajno ne ostane na sramnici, temveč odpade. Zaradi tega je za preverjanje parjenja najboljša, če podgane gojimo na rešetkah (ne na stelji) in vsako jutro preverimo dno kletke (pod rešetko), ali je prisoten kopulturni pokrovček (bel trden košček, podoben kot kos plastike).

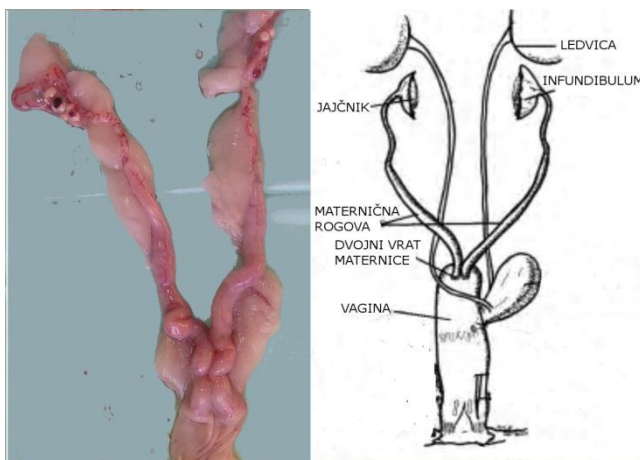
Parjenje

Tudi parjenje lahko izvajamo podobno kot pri miših, individualno ali haremsko. Oba načina parjenja imata iste prednosti in slabosti kot pri miših.

REPRODUKCIJA KUNCEV

Posebnosti rodil pri kunčicah

Spolne organe delimo na notranje spolne organe ali rodila in zunanje spolne organe. K rodilom štejemo jajčnika, jajcevoda, dvojno maternico in nožnico. Pri spolno zrelih kunčicah najdemo dva za bob velika jajčnika. Jajcevoda sta dolga in vijugava, ampula meri v premeru do 0,5 cm, spodnji deli ali isthmus pa je distalno zožen. Maternica je sestavljena iz dveh med seboj povsem ločenih rogov, dveh teles in dveh vratov maternice (dvojna maternica – *uterus duplex*), ki se združita v enojno nožnico (*vagina simplex*). Maternična rogova merita pri negravidni spolno zreli kunčici okoli 15 cm v dolžino in imata premer do 8 mm. Maternični telesi in vratova ovija zunanja ovojnica in sta ločeni samo v notranjosti. Nožnica je enojna in povezuje maternico s sramnico. Glede na svojo velikost ima kunčica sorazmerno obsežna rodila.



Slika 1: Rodila odrasle kunčice (fotografija in shematski prikaz).

Spolna zrelost

Spolna zrelost nastopi, ko je samičin organizem sposoben oblikovati zrele spolne celice – jajčeca in ko samica lahko donosi ter povrže za življenje sposobne mladiče.

Kunčice, ki jih vzrejamo v intenzivni reji za meso, dozorijo v tretjem ali četrtem mesecu starosti. Spolno zrelost dosežejo mnogo prej, kot so primerne za plemo. Pozno jeseni rojene kunčice hitreje spolno dozorijo kot tiste, ki so rojene spomladi. Spolna zrelost živali je odvisna od pasme, rejskih razmer, prehrane in letnega časa. Običajno pa so samice primerne za razplod, ko dosežejo med 75 % in 80 % telesne teže odrasle živali.

Pojatveni cikel

Kunci so poliestrične živali, ki se pariyo skozi celo leto. Če kunci niso izpostavljeni umetni osvetlitvi (15 – 16 ur), se nekoliko zniža funkcija jajčnikov v obdobju krajših dni (zima, zgodnja pomlad). Pojatveni cikel pri kunčici nima regularnega intervala, ampak so živali več ali manj stalno v pojatvi. Zunanje znake gonjenja in spremembe na vedenju živali izzovejo estrogeni. Ti hormoni poleg tega pospešujejo tudi rast in razvoj genitalnih organov in so »odgovorni« za izraženost sekundarnih spolnih znamenj (milejši videz samice od samca, samci so večji, ...). Eden izmed zunanjih znakov pojatve je otečena in pordela sramnica, saj v tem primeru 90 % takih samic dovoli zaskok in po zaskoku pride do ovulacije, medtem pa ko pri samicah, ki nimajo pordelih sramnic, samo v 10 % pride do ovulacija oziroma do oploditve. Samica, ki je v pojatvi, kaže tipične znake (privolitveni refleks), medtem ko kunčica, ki ni v pojatvi, postane agresivna do samca in/ali se mu umika. Kunčice sodijo med enaindvajset živalskih vrst iz rodu sesalcev, ki imajo izzvano ovulacijo.

Iz omenjenega je razvidno, da prihaja ob zaskoku pri kunčicah do vizualnih, vonjalnih, slušnih in taktilnih dražljajev. Ti živčni dražljaji vzpodbujajo izločanje GnRH v hipotalamusu. Od tu potuje hormon v obliki valov do hipofize, ki prične z izločanjem LH. Ta hormon povzroči v foliklih na jajčnikih cel niz biokemičnih in morfoloških sprememb, ki se končajo z ovulacijo 12 ur po zaskoku.

Ovulacijo lahko pri kunčicah izzovemo še z električnim ali mehaničnim draženjem vagine, aplikacijo bakrovih soli v vagino, z injiciranjem horionskih gonadotropinov ali z aplikacijo čistega LH.

S tem, ko se oblikujejo rumena telesa, pride pri parjenih živalih v primeru oploditve ovuliranih jajčec do brejosti. Kadar se jajčeca ne oplodijo, nastopi pri kunčicah lažna ali navidezna brejost, ki predstavlja poseben problem. Če po ovulaciji ne pride do oploditve, rumena telesa običajno propadejo v dveh dneh, če pa se funkcija rumenih teles nadaljuje, pride do t. i. lažne oziroma navidezne brejosti (ta je pogosta tudi pri psici in mački), ki traja od 15 do 18 dni. Do pojava navidezne brejosti prihaja v nekoliko večjem deležu v rejah, kjer uporabljajo umetno osemenjevanje in stimulacijo ovulacije z aplikacijo pripravkov, ki vsebujejo GnRH.

Pri živalih, ki se niso sparile, pa se prične nov cikel, ko so se rumena telesa razgradila oz. so propadli folikli, ki so dozoreli v predhodnem ciklusu in so novi folikli dosegli predovulatorno fazo.

Rumena telesa (*corpora lutea*), ki so se razvila na jajčniku pod vplivom LH, izločajo progesteron. Le-ta je zaščitnik brejosti, zmanjšuje pripravljenost maternice za krčenja ter stimulira razvoj endometrija in rast maternice med brejostjo. Izločanje progesterona zavira pri kunčicah do 19. dneva brejosti laktogeni učinek prolaktina.

Povečana količina progesterona pri samicah znižuje željo po parjenju, kar se kaže s slabše izraženim privolitvenim refleksom na začetku brejosti, kasneje, najbolj izrazito pa v drugi polovici brejosti, pa samice kažejo izrazit privolitveni refleks.

Brejost in porod

Za vzdrževanje brejosti sta potrebna tako progesteron kot estradiol. Prvih 6 dni brejosti lahko vzdržuje brejost samo estradiol (Goodman in Neil, 1976). Estradiol deluje pospeševalno na proliferacijo celic v maternici. Za sekrecijo materničnega mleka (embriotrophe), s katerim se zarodek hrani, pa je potrebno hkratno izločanje progesterona in estrogenov, kajti samo estradiol ni dovolj za produkcijo »materničnega mleka«, katerega ena bistvenih sestavin je glikoprotein blastokinin, ki se pojavi v krvi 3. dan brejosti in se preneha pojavljati 10. dan. Ta protein je nujno potreben za preoblikovanje morul v blastociste. Količina progesterona v krvi od 3. dneva do 15. dneva brejosti narašča, nato pa ostaja na isti ravni do obdobja tik pred porodom.

Osnovni signal za začetek poroda se sproži z izločanjem fetalnih kortikosteroidov (aktivacija osi hipotalamus – hipofiza – nadledvična žleza fetusa). Prostaglandini, ki jih po aktivaciji začne izločati maternica in placenta, pa povzročijo razgradnjo rumenega telesa in s tem začetek poroda. Normalen porod traja 15 do 30 minut in je seveda odvisen od števila mladičev. Velikost gnezda je zelo različna in se giblje od 1 pa do 20 mladičev. V povprečju pa je velikost gnezda med sedmimi in devetimi mladiči.

Laktacija

Laktacija predstavlja končno obdobje razmnoževalnega kroga pri sesalcih. Fiziološko stanje mlečne žleze je povezano z reprodukcijskim stanjem živali. Med prvo brejostjo se zgradi alveolarni in kanalni sistem, pri starejših živalih pa je le-ta v znatni meri že zgrajen in se med brejostjo samo obnavlja. Razvoj in obnova lobulo-alveolarnega in cevastega sistema teče pod kontrolo žlez z notranjim izločanjem.

Ob času poroda se mlečna žleza spremeni iz hitro rastočega tkiva, ki le v manjši meri izloča majhne količine kolostruma, v tkivo, ki skoraj ne raste več, zato pa izloča velike količine mleka. Med verjetnimi dražljaji za te spremembe so s porodom povezane spremembe v količinah hormonov v krvi. Med brejostjo najdemo v krvi visoke nivoje progesterona, estradiola, adrenalnih steroidov in placentalnega laktogena, medtem ko so nivoji prolaktina različni, vendar na splošno nizki. Po porodu pa so koncentracije navedenih hormonov nizke ali jih ni. Izjema je prolaktin, ki je tedaj prisoten v visokih koncentracijah.

Sproščanje mleka predstavlja drugo fazo laktacije. V tem procesu se pod vplivom sesanja ali molže sprošča hormon oksitocin iz zadnjega režnja hipofize, ki povzroči krčenje mioepitelnih celic, ki obdajajo alveole v mlečni žlezi. Krčenje le-teh ima za posledico iztiskanje mleka v kanalni sistem in mlečno cisterno.

Parjenje in intenzivnost reprodukcije kuncev

Za parjenje velja pravilo, da samico premestimo k samcu, ker so praviloma samci v svoji kletki aktivnejši, samice pa bolj izražajo privolitveni refleks. Glede na intenzivnost reprodukcije poznamo tri glavne načine: ekstenzivni način, polintenzivni in intenzivni način reje oziroma reprodukcije kuncev. Pri prvem načinu ponovno pripuščamo samice po koncu laktacije, ki traja do šest tednov. Pri tem načinu pripuščamo samice na dva meseca in pol. Pri pol intenzivnem načinu izkoriščanja pa samico pripuščamo 10 do 20 dni po porodu, trajanje laktacije pa je od 4 do 5 tednov. V tem primeru je samica že ponovno breja med laktacijo (pred odstavitvijo mladičev). Pri tem načinu pripuščamo samico vsakih 42 dni (30- 31 dni brejosti + 10 do 11 dni po porodu = 42 dni). Pri tretjem načinu pa samico pripuščamo takoj po porodu (prvi oziroma drugi dan) ali pa na predvideni dan, to je tretji do četrti dan po porodu in tako dosežemo, da se samice pripuščajo na 35 dni. Podoben učinek dosežemo, če je samec stalno prisoten, oziroma ima dostop do samice po porodu. V tem primeru, ki se tudi dogaja v naravi pri divjih kuncih, samec večkrat zaskoči samico v prvih 48 urah po porodu. Pri taki obliki pa moramo onemogočiti dostop samice, ki je v laktaciji, do druge samice po porodu, ker jo naraven instinkt vodi k poboju mladičev druge samice.

LITERATURA

1. Adams CE. Induction of ovulation and AI techniques in the rabbit. Vet Rec 1972: 194–7.
2. Goodman A, Neil JD. Ovarian regulation of postcoital gonadotropin release in the rabbit. reexamination of functional role for 20 alphadehidroxyprogesterone. Endocrinology 1976; 99: 852–60.
3. Grujić A. Kuničarstvo. Zagreb: Znanje, 1985.
4. Hafez ESE. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Philadelphia: Lea and Febiger, 1970.
5. Hafez ESE. Reproduction in farm animals. Philadelphia: Lea and Febiger, 1980.
6. Kopanski R. Uzgoj kunića. Beograd: Nolit, 1988.
7. Milligan SR. Induced ovulation in mammals. In: Finn CA, ed. Oxford review in reproductive biology. London: Clarendon Press, 1982: 1–46.

8. Lebas F, Coudert P, Rouvier R, de Rochambeau H. The rabbit: husbandry, health and production. Rome: Food and Agriculture Organization UN, 1986 (FAO Animal Production and Health Series, no. 21)
<http://www.fao.org/docrep/014/t1690e/t1690e.pdf>
9. Hedrich JH, Bullock GJ. The laboratory mouse. London: Elsevier; Academic Press, 2004.
10. Krinke GJ. The laboratory rat. London: Elsevier; Academic Press, 2000.
11. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1993.

PARAMETRI OKOLJA, KI SE LAHKO STANDARDIZIRAJO

Laboratorijske živali so nastanjene v določenem okolju, za katerega želimo, da je čim bolj standardizirano. Okolje je namreč zelo pomembno za počutje živali, v končni fazi pa to vpliva na rezultate raziskav, ki jih izvajamo. Slabo počutje živali vpliva na večjo variabilnost opazovanih parametrov v poskusu in zato moramo včasih uporabiti večje število živali ali poskus celo ponoviti. Kadar govorimo o okolju, s tem razumemo mikrookolje, se pravi neposreden prostor bivanja (kletka, boks), ter makrookolje, to je prostor, v katerem so postavljene kletke ali boksi. Tako mikrookolje kot makrookolje sta med seboj povezani in soodvisni, vendar parametri med njima niso nikoli enaki. Pri standardizaciji okolja se orientiramo po parametrih makrookolja, pri čemer računamo, da bodo podobni parametri tudi v mikrookolju.

Dobro počutje živali in zmanjševanje njihovega števila zaradi manjše variabilnosti okolja, ki je posledica standardizacije pogojev okolja, sta dva od treh elementov načel 3R. Standardizirano okolje, ki je prilagojeno živalskim vrstam, zmanjšuje ta stres in trpljenje v času trajanja poskusa, kar je princip t. i. animal welfare. Dejavniki okolja, pri katerih se opravlja standardizacija so: mikrobiološki, fizikalni in kemični, pri čemer je pomembnejša standardizacija fizikalnih dejavnikov, ki lahko vplivajo tudi na ostale dejavnike okolja.

SVETLOBA

Svetlobna perioda

Laboratorijske živali izvirajo iz divjih vrst, za katere je značilno, da so prilagojene aktivnosti v času, ko dnevna svetloba ni najbolj intenzivna. Temu primerno je potem potrebno prilagoditi svetlobo tudi v laboratorijskih pogojih. Pri standardizaciji svetlobe lahko uravnavamo periodo osvetlitve, valovno dolžino svetlobe in jakost svetlobe. Največji vpliv ima na živali perioda osvetlitve, se pravi dnevno-nočni ritem osvetlitve. Že majhne spremembe svetlobnega ciklusa lahko pri nekaterih živalih vplivajo na reprodukcijo, prirast, splošno zdravstveno stanje ter aktivnost živali. Za lažjo standardizacijo svetlobne periode morajo biti prostori z laboratorijskimi živalmi brez oken, tako da naravna svetloba ne moti umetno uravnavane periode. Najpogosteje uporabljena svetlobna perioda je 12 ur svetlobe, ki ji sledi 12 ur teme, pri čemer moramo zagotoviti enakomerno razporeditev svetlobe, albino živali pa naj bi imele tudi temnejše koticke.

Valovna dolžina svetlobe

O vplivu valovne dolžine svetlobe, se pravi barve svetlobe na vedenje in počutje živali, se ne ve veliko. Opravljeni so bili sicer poskusi, kjer so proučevali vpliv različnih barv svetlobe na živali, vendar so rezultati včasih kontradiktorni, včasih pa se ugotovi določen vpliv na vedenje, aktivnost ali počutje živali. Valovna dolžina (barva) svetlobe je odvisna od vrste izvora svetlobe, pa tudi od vrste in stanja materiala, iz katerega so narejene kletke.

Jakost svetlobe

Jakost osvetlitve ima zaznavne učinke na nekatere fiziološke procese, na reprodukcijo, obnašanje živali in na potek patoloških procesov pri živalih. Posebno pozornost moramo posvetiti jakosti svetlobe pri vzgoji albino živali, pri katerih je običajno svetloba preveč intenzivna, tako da v daljšem obdobju lahko pride do okvar na očesni veznici.

HRUP

Živali slišijo zvočne frekvence v drugačnem razponu kot človek. V za človeka neslišnem območju se mnoge živali med seboj sporazumevajo v različnih življenjskih obdobjih. Pri hrupu so pomembni dejavniki frekvenca zvoka, jakost zvoka ter interval in trajanje hrupa. Hrup je tako močan dejavnik okolja, da lahko vpliva na številne fiziološke funkcije in na obnašanje živali. Ker živali slišijo tudi višje frekvence, kot jih zazna človek, moramo biti pozorni, da kakšna naprava, ki po človeškem zaznavanju ne proizvaja zvoka (alarm v mirovanju), v hlevčku za poskusne živali s hrupom ne onesnažuje okolja. Živali zelo vznemiri nenaden nepričakovan hrup veliko bolj kot konstanten zvok, ki je del zvočnega ozadja v okolju in na katerega so živali prilagojene. Jakost zvoka v hlevčkih za poskusne živali naj ne bi presegala 45-50 dB, kar moramo upoštevati, ko opravljamo različna dela. Priporočljivo je, da so prostori, kjer se proizvaja močnejši hrup, ločeni od ostalih prostorov, kjer so nastanjene živali. Nekatere poskusne živali pa že same za sporazumevanje proizvajajo hrup višji od 50 dB (prašiči, psi), zato v takih rejah veljajo drugačni standardi.

TEMPERATURA IN VENTILACIJA

Večina laboratorijskih živali je majhnih, torej imajo razmeroma veliko telesno površino glede na maso. Tega se je potrebno zavedati, saj se takšne živalce hitro podhladijo ali pa pregrejejo. Temperatura je torej izredno pomemben dejavnik, pri fizioloških procesih. Pri delu s poskusnimi živalmi moramo torej posebej paziti, kakšno temperaturo potrebuje živalska vrsta, paziti moramo, da živali po nepotrebnem ne izgubljajo telesne temperature, npr. z mokrim nasteljem ali če si zmočijo kožuh z vodo iz napajalnika. Ko je temperatura izven termoneutralne cone za določeno žival, se vklopijo prilagoditveni mehanizmi in v takem stanju so živali neprimerne za izvajanje poskusa, saj meritve ne odražajo dejanskih rezultatov. Za živalske vrste so predpisana temperaturna območja (vrsta, odlakanost, starost, stanje živali), prav tako tudi velikost kletke za določeno število živali, kajti prenaseljenost lahko vodi do povišanja temperature okolja.

S temperaturo je povezana ventilacija prostorov, saj z neprimerno ventilacijo ne moremo zagotavljati primerne temperature okolja (prepih). Ventilacija je pomembna za odstranjevanje odvečnih plinov, za dovajanje kisika, v kombinaciji s filtracijo pa tudi za odstranjevanje praha in mikrobov. Za pravilno ventilacijo prostorov je potrebno upoštevati velikost prostorov, naseljenost prostora z živalmi, kapacitete ventilacijskega sistema, postavitev ventilacijskih rež, lokacijo kletk. Standardi za ventilacijo predvidevajo 8- do 20-kratno zamenjavo volumna zraka v prostoru glede na zahteve; pri gostejši naseljenosti je potrebna večkratna zamenjava zraka. Ventilacija mora zagotavljati zamenjavo zraka po celotnem volumnu prostora.

VLAŽNOST

Laboratorijske živali nimajo sposobnosti potenja, zato telesno temperaturo regulirajo s pomočjo izhlapevanja vode (evaporacija) preko celega telesa. V naravi se namreč sorodniki laboratorijskih živali skrijejo v temperaturno primerna področja (rovi), kjer se hladijo. Za uspešno evaporacijo je pomembna primerna relativna zračna vlaga. Pri konstantni temperaturi različen nivo zračne vlage vpliva na konzumacijo krme, v določenih poskusih pa tudi na absorbcijo substanc preko kože, vpliva na sušenje stelje v kletkah kot tudi na razkroj organskih snovi in na nastajanje amoniaka. Zračna vlaga je v tesni povezavi z nekaterimi boleznimi, npr. respiratorne bolezni ali bolezen obročkastega repa.

NASTILJ

Nastilj mora biti takšen, da se na njem živali dobro počutijo, da absorbira vlago in vonje, ne sme imeti intenzivnega vonja, ne sme biti škodljiv za živali, če ga zaužijejo, mora biti mikrobiološko in kemično neoporečen ter ne sme vsebovati finih prašnih delcev. Najpogostejše so to različne oblike oblancev,

lahko tudi žaganje, rezani ovoji koruznih storžev, razrezano lubje po ekstrakciji tanina, seno ipd. Različne vrste in kvalitete nastilja so dostopne na tržišču, primerno pakirane tudi za daljše skladiščenje.

MATERIALI NASTANITVENIH PROSTOROV

Materiali, ki neposredno omejujejo mikrookolje, imajo vpliv na počutje živali. Zavedati se moramo, da so ti materiali velikokrat v neposrednem stiku z živaljo, pri čemer je pomembno prevajanje in zaznavanje temperature materiala, prav tako ti materiali vplivajo na osvetljenost mikrookolja. Priporočljivo je, da so materiali takšni, da jih živali ne morejo gristi, da se njihova površina lahko čisti in dezinficira ter da pod določenimi fizikalnimi pogoji ne spreminjajo konsistence in oblike.

POGOJI ZA NASTANITEV NEKATERIH ŽIVALI

Miš

Divje miši živijo v skupinah z dobro razvito socialno hierarhijo. Čeprav se je obnašanje laboratorijskih miši zaradi dolgotrajnega gojenja v ujetništvu nekoliko prilagodilo, pa se v veliki meri še vedno obnašajo kot njihove divje vrstnice. Miši so zelo socialne živali, zato je vsaka osamitev zanje velik socialni stres. V preteklosti se je pozornost pri gojenju usmerjala predvsem zadostitvi minimalnih higienskih pogojev ob upoštevanju ekonomskega vidika, zelo malo pa se je upoštevalo potrebe po okolju, v katerem bi se miši lahko obnašale naravno. V zadnjih letih se zato vedno več pozornosti posveča tudi temu vidiku gojenja laboratorijskih miši, saj je to pomembno tudi pri izvajanju poskusov – le popolnoma zdrava (to vključuje tudi stres zaradi neprimerne nastanitve) normalna žival je primerna za izvedbo biomedicinskih poskusov.

Za miši so najbolj primerne kletke iz materiala makrolon s tesnim pokrovom, ki preprečuje pobeg. Pokrov je običajno iz kovinske rešetke, ki ima prostor za hrano in steklenico z vodo (ali napajalnik). Poleg tega lahko imajo kletke še dodaten pokrov s filtrom. Ta zmanjšuje zunanje vplive in preprečuje prepih zaradi klimatizacije prostorov, vendar pa lahko ob ne dovolj pogostem odpiranju pokrova pride do zasičenja mikroatmosfere s snovmi iz urina, kar ima lahko škodljive posledice za zdravje miši v takih kletkah. Minimalna višina kletke mora biti 12 cm, površina pa je odvisna od števila miši in načina gojenja.

Samice lahko gojimo v skupinah brez posebnih omejitev, vendar skupine naj ne bi presegale 30 živali. Bolj pozorni moramo biti pri samcih, ki pogosto kažejo agresivno obnašanje. Običajno lahko gojimo skupaj samce vrstnike, ki so od odstavitve združeni z drugimi samci. Odraslih samcev, predvsem takih, ki so se že parili, pa ne smemo združevati, saj bo prišlo do medsebojnih napadov, ki se lahko končajo tudi s smrtjo.

Za nastilj v kletkah običajno uporabljamo žagovino, ki pa ne sme biti pre drobna (ne sme vsebovati drobnega prahu) in mora biti mikrobiološko ter kemično neoporečna. Poleg žagovine sta za nastilj primerna tudi razrezan papir ali bombaž. Priporočljivo je, da samicam pred porodom dodamo v gnezdo še dodaten material za izdelavo gnezda. To je lahko razrezan papir, kosi kartona ali posebej pripravljeni kosi celuloze (nestlet), ki jih lahko kupimo pri proizvajalcih opreme za laboratorijske živali. Iz takšnega materiala si bo samica naredila gnezdo, v katerem bo skrbela za mladiče, zaradi česar bodo manjše izgube mladičev. V zadnjih letih se vse bolj uveljavlja tudi dodajanje t. i. igračk oziroma obogatiteljev okolja v kletke z mišmi. To so lahko različne plastične igrače ali manjši labirinti, s katerimi se lahko živali zaposlijo in so zaradi tega manj izpostavljene stresu, kar pozitivno vpliva na izvedbo poskusov. Pri nekaterih poskusih je potrebno miši gojiti na tleh iz kovinske mreže, ki preprečuje neposreden stik živali s steljo. Takšna vrsta reje je za miši neprimerna in jo moramo zato uporabljati le, ko je to zares neobhodno potrebno in čim krajši čas. Nikoli pa na kovinskih rešetkah ne smemo gojiti samic z mladiči, saj bodo zaradi odsotnosti materiala za gnezdenje mladiči poginjali zaradi podhladitve.

V prostorih za gojenje laboratorijskih miši moramo imeti tudi natančno nadzorovane mikroklimatske pogoje, saj v neurejenih in menjajočih se mikroklimatskih pogojih rezultati poskusov ne bodo pravilni. V prostorih za gojenje miši more biti stalna temperatura med 20–24 °C, relativna vlaga od 50–70 %, celoten zrak v prostoru pa naj bi se zamenjal približno 15-krat v eni uri. V zadnjih letih so se uveljavili sistemi za individualno prezračevanje, pri katerih ne potrebujemo klimatiziranega celotnega prostora, v katerem gojimo miši, temveč sistem individualnega prezračevanja zagotavlja natančno mikroklimo v vsaki celici posebej. Miši moramo gojiti v prostorih s stalno dolžino dneva (prostori brez dnevne svetlobe z avtomatskim prižigom in ugašanjem luči), ki naj bi bila 12 ur svetlobe in 12 ur teme ali 14 ur svetlobe in 10 ur teme. Miši so namreč sezonske živali, zaradi česar so njihovi fiziološki odzivi različni glede na letni čas oziroma dolžino dneva, kar lahko vpliva na rezultate poskusov.

Podgana

Podgane so po obnašanju podobne mišim, zato so tudi zahteve za gojenje podobne pri obeh vrstah. Tudi podgane najpogosteje gojimo v kletkah iz makrolona s pokrovom iz kovinske rešetke, na katerega namestimo hrano in steklenico z vodo ali napajalnik. Podgane so običajno manj agresivne kot miši, tako da lahko pogosto gojimo skupaj tudi odrasle samce, vendar pa moramo biti pozorni na znake agresivnega obnašanja in v primeru agresivnosti samce ločiti, da preprečimo poškodbe. Podganam moramo tako kot mišim v kletkah nameniti dovolj prostora, najmanjša višina kletke je 14 cm.

Za nastilj v kletkah običajno uporabljamo žagovino, ki ne sme biti predebna (ne sme vsebovati drobnega prahu) in mora biti mikrobiološko ter kemično neoporečna. Poleg žagovine sta za nastilj primerna tudi razrezan papir ali bombaž. Tako kot za miši se tudi za gojenje podgan v zadnjih letih vse bolj uveljavlja dodajanje t. i. igračk oziroma obogatiteljev okolja v kletke z mišmi. To so lahko različne plastične igrače ali manjši labirinti, s katerimi se lahko živali zaposlijo in so zaradi tega manj izpostavljene stresu, kar pozitivno vpliva na izvedbo poskusov. Pri nekaterih poskusih je potrebno podgane gojiti na tleh iz kovinske mreže, ki preprečuje neposreden stik živali s stelo. Takšna vrsta reje je za podgane neprimerna in jo moramo zato uporabljati le, ko je to zares neobhodno potrebno in čim krajši čas.

V prostorih za gojenje laboratorijskih podgan moramo imeti tako kot za miši natančno nadzorovane mikroklimatske pogoje, saj v neurejenih in menjajočih se mikroklimatskih pogojih rezultati poskusov ne bodo pravilni. V prostorih za gojenje podgan mora biti stalna temperatura med 20–24 °C, relativna vlaga od 50–60 %, celoten zrak v prostoru pa naj bi se zamenjal približno 10 do 15-krat v eni uri. Pri podganah moramo biti posebej pozorni na primerno temperaturo, saj so zelo podvržene hipertermiji, zaradi katere lahko pride tudi do pogojev. Predvsem v prevelikih skupinah živali lahko pride do hitrega porasta temperature v kletki, ki lahko povzroči temperaturni šok in pogin. Paziti moramo tudi na relativno vlago, ki ne sme za daljši čas pasti pod 45 %, saj se v takšnem primeru lahko predvsem pri mladih podganah pojavi konstrikcija (skrčenost) repa ob korenu, kar lahko privede tudi do nekroze in hujših poškodb. Podgane moramo tako kot miši gojiti v prostorih s stalno dolžino dneva (prostori brez dnevne svetlobe z avtomatskim prižigom in ugašanjem luči), ki naj bi bila 12 ur svetlobe in 12 ur teme ali 14 ur svetlobe in 10 ur teme. Pri podganah in miših naj bi bila svetloba v svetlem času dneva čim bolj podobna zunanji svetlobi, ne sme pa biti premočna, predvsem pri albino živalih (BALB/c miši, Wistar podgane), saj lahko pride do poškodbe roženice in oslepitve.

Preglednica 1: Zahteve za nastanitev miši in podgan.

Vrsta živali	Teža	Površina tal	Temperatura	Relativna vlaga
Miš	do 10 g do 25 g nad 25 g	40 cm ² 80 cm ² več kot 100 cm ²	20–24 °C	50–65 %
Podgana	do 200 g do 400 g	150 cm ² 250 cm ²	20–24 °C	50–65 %

Kunec

Pri kuncih obstaja veliko število različnih pasem, ki so razdeljene glede na velikost živali in glede na vrsto in barvo kožuha. Pasma izhajajo iz evropskega divjega kunca (*Oryctolabus cuniculus*). Kot laboratorijska žival se najpogosteje uporablja pasma holandec, ki doseže telesno maso do 2 kg ter beli novozelandski, ki doseže telesno maso med 2 in 5 kg.

Kunce imamo najpogosteje nastanjene v kletkah iz nerjavečega jekla, velikost mora ustrezati predpisanim standardom. V zadnjem času se za nastanitev kuncev uporabljajo tudi kletke iz plastičnih materialov ali pa se živali vzgajajo v skupni reji v ogradi. Kletke morajo biti izdelane tako, da si zlasti mlade živali ne morejo v mrežno ali luknjasto dno kletke ukleščiti nog in se tako poškodovati. Kletke morajo biti primerne za velikost živali, tako da kunec lahko sedi in leži iztegnjen. Moške živali nastanimo ločeno takoj po odstavitvi, ženske živali pa nastanimo individualno pri starosti 12 tednov. Če nam poskusni pogoji dovoljujejo, imamo lahko živali nastanjene v skupinski ogradi, vendar se moramo zavedati, da v skupini spolno zrele živali branijo svoj teritorij. Hrana se živalim ponudi *ad libitum* v krmilnikih, tako da živali ne morejo onesnažiti hrane z lastnimi iztrebki. Vodo živalim ponudimo preko napajalnega sistema ali v steklenicah.

Čiščenje kletk moramo opravljati 2- do 3-krat tedensko, ker urin kuncev vsebuje kristale in se ob nerednem čiščenju prilepi na podlago. Periodično je potrebno kletke tudi razkuževati. Osnovne zahteve in potrebe kuncev so prikazane v preglednici 2.

Preglednica 2: Zahteve za nastanitev kuncev.

Zahteva	Vrednost
Temperatura	15–21 °C
Vlaga	50–60 %
Ventilacija (menjava zraka/h)	5–15
Režim svetloba /tema	12/12
Minimalna površina tal (cm ²)	
Individualna reja	1 kg: 1400
	2 kg: 2000
	3 kg: 2500
	4 kg: 3000
	5 kg: 3600
Individualna reja z gnezdrom	1 kg: 3000
	3 kg: 4000
	5 kg: 5000
Minimalna višina kletke (cm)	1–2 kg: 30
	3 kg: 35
	4–5 kg: 40
Dnevna poraba vode (ml/100 g)	5–10
Dnevna poraba hrane(g/100 gtt)	5

Morski prašiček

Morski prašički so socialne živali, zato je dobro da jih imamo nastanjene v skupini. Morski prašički so redko agresivni do sovrstnikov, razen če v skupino nastanimo novega spolno zrelega samca, ko se med njima vname boj. Živali nastanimo v boksih, kjer so stranice visoke 25 cm, saj morski prašički ne plezajo. Dno boksov naj bo iz trdnega materiala, na katerega namestimo nastilj. Za morske prašičke je manj priporočljivo, da so nastanjeni v polipropilenskih kletkah s pokrovom iz kovinske mreže. V takšnih kletkah dno prekrijemo z nastiljem, v kletke nastanimo po dve živali, paziti moramo tudi na primerno višino kletke. Morski prašičkom moramo v vodo dodajati vitamin C (220 mg/l) ali jim polagamo hrano, ki je prirejena posebej za morske prašičke. Posebno pozornost moramo posvetiti nastilju, ki ne sme vsebovati prahu, ki lahko povzroča obstrukcijo prepucija in s tem motnje erekcije ali vnetje prepucija in vagine. Morski prašički so občutljivi na nihanje vlage in temperature, so zelo

nervozne živali in jih hitro zagrabi panika, zlasti ob nenadnem nepoznanem hrupu. Osnovne zahteve in potrebe morskih prašičkov so prikazane v preglednici 3.

Preglednica 3: zahteve za nastanitev morskih prašičkov.

Zahteva	Vrednost
Temperatura	20–24 °C
Vlaga	50 %
Ventilacija (menjava zraka/h)	10–15
Režim svetloba /tema	14/10
Minimalna površina tal (cm ²) za odraslo žival	600
Samica z gnezdrom (cm ²)	1200
Skupina (cm ² /odrasla žival	1000
Minimalna višina kletke (cm)	18
Dnevna poraba vode (ml/100 gtt)	10
Dnevna poraba hrane(g/100 gtt)	6

Gerbil

Gerbili izvirajo iz Mongolije in severne Kitajske. Pri gerbilih so značilni epileptični napadi, ki imajo genetsko osnovo. Kot laboratorijske živali jih gojimo v kletkah s trdnim dnom, na katerega položimo le tanko plast nastilja. V takšnih pogojih se dobro razmnožujejo, problemi z reprodukcijo pa nastanejo, če jih imamo nastanjene na mrežasti podlagi. Kletke morajo biti visoke vsaj 15 cm, tako da se živali lahko postavijo na zadnje noge. Kletke čistimo enkrat na 14 dni, pozorni pa moramo biti pri premeščanju živali, saj v novem okolju pogosto doživijo epileptični napad, če pa je gostota živali prevelika, prihaja lahko do medsebojnih bojov in poškodb.

Sirijski (zlati) in kitajski hrček

Hrčki so samotarske nočne živali, zato jih nastanimo v kletke individualno razen parov za reprodukcijo, ki jih nastanimo skupaj za daljše obdobje. Samice so bolj agresivne kot samci. Hrčke nastanimo v kletkah s trdnim dnom (primerne so tudi kletke za miši in podgane) in nastiljem, koprofagija (uživanje iztrebkov) se pojavlja tudi v kletkah z mrežnim dnom. Če hrčke vznemirjamo podnevi med spanjem, lahko postanejo agresivni in nas ugriznejo, zato jim spremenimo dnevno nočni ritem. Pri dajanju hrane moramo biti posebej pozorni, da jo živali dosežejo, saj imajo hrčki bolj ploščat smrček kot miši in podgane. Mladički začnejo uživati trdno hrano 7–10 dni po porodu, zato moramo hrano dostaviti neposredno h gnezdru, prav tako mora biti vrat napajalnikov dostopen mladičkom.

LITERATURA

1. Broom D.M. The scientific assessment of animal welfare. Appl Anim Behav Sci 1988; 20: 5–19.
2. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. Amsterdam: Elsevier, 1993.
3. Dawkins M. Animal suffering: the science of animal welfare. London: Chapman and Hall, 1980.
4. Clough G. Environmental effects on animals used in biomedical research. Biol Rev 1982; 57: 487–523.

KAJ JE MIKROBIOLOŠKA STANDARDIZACIJA ŽIVALI

Če načrtujemo poskuse na določenem živalskem modelu, potem moramo skrbno pretehtati, kakšne živali bomo izbrali. Danes ni dovolj le vrsta živali in čim manjše število, temveč za pravilne rezultate potrebujemo tudi podatke o mikrobi, ki naseljujejo poskusne živali (kolonizacija). Če torej poznamo mikrofloro, se pravi mikrobe, ki so prisotni na živalskem telesu ali v njem, potem v poskusih lahko izključimo vpliv neželene mikroflore na rezultate poskusa, obvarujemo osebe, ki z njimi rokuje, da se ne more okužiti z morebitnimi povzročitelji bolezni, ki se prenašajo z živali na človeka, torej uporabljamo zdrave živali. Živali, ki so mikrobiološko opredeljene, potrebujejo natančno določen način reje in oskrbe, zahtevajo redno mikrobiološko kontrolo, nekatere kategorije takšnih živali pa potrebujejo posebne postopke za njihovo vzgojo.

KONVENCIONALNE ŽIVALI

Konvencionalne živali izvirajo iz živali, ki živijo v naravi in so kolonizirane z naravnimi mikroorganizmi. Vzgajamo jih brez posebnih preventivnih higienskih ukrepov. V to kategorijo prištevamo tiste živali, pri katerih je mikrobiološki status neznan ali nejasen, zanje pa kot pravilo velja, da jih imamo pred vhlevljanjem ali uporabo določen čas v karanteni. V kolikor se izkaže, da so živali po karanteni zdrave, jih uporabljamo za dane namene. Trajanje karantene temelji na najdaljši inkubacijski dobi, značilni za določeno okužbo. V času karantene lahko pričakujemo, da se bodo pokazala vsa značilna klinična znamenja bolezni. Pri obravnavi laboratorijskih živalih se moramo zavedati, da večina okužb poteka v latentni obliki, se pravi brez značilnih kliničnih znamenj. Prenehanje karantene torej temelji na negativnih rezultatih presejalnih in potrditvenih diagnostičnih preiskav, ki potrdijo odsotnost patogenih mikroorganizmov. Kot alternativo karanteni se uporabljajo izolatoriji, kjer živali osamimo iz okolja ali pa živali le primeren čas prilagajamo novemu okolju (aklimatiziramo), kjer se npr. pri psih in mačkah opravi cepljenje in dehelmintizacija.

Mikroflora

Avtohtona ali normalna mikroflora se pri konvencionalnih živalih nahaja na koži, na sluznicah ustne votline, respiratornega, urogenitalnega in gastrointestinalnega trakta. Takšna normalna mikroflora omogoča odpornost proti potencialno patogenim mikroorganizmom zaradi bakterijskega antagonizma, bakterijske interference in zaradi preprečevanja kolonizacije. Število bakterijskih vrst normalne flore ni poznano. Ocenjuje se, da je npr. pri miši prisotno okoli 500 različnih bakterijskih vrst in da je v črevesju prisotnih od 10^{10} do 10^{11} bakterij v gramu.

GNOTOBIOTIČNE ŽIVALI

Gnotobiotične živali (reja v nadzorovanih pogojih) so kategorija živali, pri katerih je prisotna popolnoma poznana mikroflora, torej so mikrobiološko standardizirane. Če pri živalih ni prisotnih nobenih mikroorganizmov, potem te živali sodijo v kategorijo mikrobov proste živali (Germ Free: GF živali). Prav tako v kategorijo gnotobiotičnih živali spadajo GF živali, pri katerih najdemo enega ali več znanih mikroorganizmov, in GF živali, katere so umetno okužene z znano, točno določeno mikrofloro, ki preprečuje oportunistične okužbe (Colonization Resistant Flora: CRF živali). Pri CRF živalih ni natančno poznana sestava mikroflore, npr. mišja enterična mikroflora. CRF živali se prav tako kot GF živali gojijo v izolatorijih, kjer se nekatere vrste živali lahko celo razmnožujejo. CRF živali se uporabljajo kot začetek SPF vzreje (Specific Pathogen Free: SPF živali), ki poteka v posebnih pogojih z visokimi preventivnimi higienskimi ukrepi, ki preprečujejo neželjeno kontaminacijo z mikrobi.

Mikrobov proste živali (GF živali) pridobimo s postopkom rederivacije (ponovna vzgoja). Pri laboratorijskih živalih je to postopek, kjer materi tik pred porodom kirurško v sterilnih pogojih odstranijo gravidno maternico, ki jo preko razkužilne kopeli prenesejo v sterilen izolatorij, kjer se nato odpre in iz nje odvzame mladičke. Pri večjih živalih pa se postopek opravi s carskim rezom, kjer tako rojene mladičke takoj prenesejo preko razkužilne kopeli v sterilne pogoje. Mladički se nato v sterilnih pogojih dojijo in vzgajajo ročno ali s pomočjo ustreznih krušnih mater. S postopkom rederivacije običajno dobimo GF živali, vendar občasno pri mladičih najdemo mikroorganizme, s katerimi so se kontaminirali preko matere v času brejosti. Tak prenos mikroorganizmov imenujemo vertikalni prenos (prenos na naslednjo generacijo) in najpogosteje poteka preko placente, zlasti če je mati v času brejosti prebolevala aktivno okužbo.

Anatomske in fiziološke lastnosti GF živali

Pri GF živalih so značilne morfološke in fiziološke spremembe (anomalije) v primerjavi s konvencionalnimi živalmi. Slepno črevo je močno povečano in napolnjeno s tekočo vsebino, stena je tanka in histološko slabše razvita kot pri konvencionalnih živalih, GF živali izločajo tekoče iztrebke. Če živali ne gojimo v striktno sterilnih pogojih, potem se v prebavnem traktu takšnih živali sčasoma naselijo aerobne ali fakultativno anaerobne bakterije, katerih prisotnost v črevesju običajno vodi do smrti živali zaradi črevesnih okužb.

Uporaba GF živali

Najpogosteje se uporabljajo za proizvodnjo protivirusnih cepiv, kjer so takšne živali izvor celic, na katerih gojimo določen virus, prav tako se uporabljajo pri proučevanju vpliva bakterij na biotransformacijo snovi vnesenih *per os*, pogosto se uporabljajo v raziskovanju raka in imunoloških raziskavah ter pri proučevanju črevesne ekologije in patogeneze različnih okužb.

SPF ŽIVALI

SPF (Specific Pathogen Free) živali so živali, ki so brez določenih potencialno patogenih mikroorganizmov. To kategorijo živali gojimo v pogojih, ki ne zagotavljajo popolne ločitve vplivov okolja, zlasti iz mikrobiološkega vidika. Tako se živali, običajno so to mikrobov proste živali, s katerimi začenjamo SPF rejo, sčasoma kolonizirajo z različnimi mikroorganizmi, ki so prisotni v okolju, predvsem preko oskrbnikov živali. SPF živali ne smatramo kot mikrobiološko standardizirane živali. Pri mikrobiološkem spremljanju takšnih živali se preverja le odsotnost določenih potencialno patogenih mikroorganizmov in ne katere vrste mikroorganizmov lahko pri teh živalih potrdimo. SPF živali tako s časom pridobivajo mikrobiološke, fiziološke in anatomske lastnosti konvencionalnih živali.

Uporaba SPF živali

SPF živali se uporabljajo pri testiranju varnosti različnih bioloških proizvodov, pri poskusih, kjer ne sme biti vpliva različnih okužb, pri proučevanju staranja, v onkologiji, v imunologiji. Življenjska doba SPF živali je običajno daljša kot pri konvencionalnih živalih.

IZVORI IN POTI KONTAMINACIJE

Laboratorijske živali se lahko kontaminirajo s potencialno patogenimi mikroorganizmi iz različnih virov in po različnih poteh. Vnos mikrobov z novo nabavljenimi laboratorijskimi živalmi, kjer ni preverjen mikrobiološki status, je pogost vzrok kontaminacije reje kljub ostalim higienskim ukrepom. Reja se prav tako neželeno okuži z biološkim materialom, med katerega štejemo serum, ascites, različne celice, tkiva in organe. Zavedati se moramo, da so laboratorijske živali pogosto okužene z mikroorganizmi, ki jih ne moremo gojiti v *in vitro* pogojih, in če uporabljeni biološki material izvira od takšnih živali, z njim okužimo rejo. Po tej poti se reje okužijo z različnimi virusi (*Coronavirus*, *Ectromelia* virus *Hanta* virus), mikoplazmami in celo bakterijami (*Bacillus piliformis*). Pomemben dejavnik pri okužbi

laboratorijskih živali so tudi domače hišne živali, ki jih imajo doma oskrbovalci in ostalo osebje, ki dela z laboratorijskimi živalmi. Ljudje so v tem primeru le mehanski prenašalci mikroorganizmov, zato je v takšnih primerih osebju pogosto prepovedano posedovati domače ljubljence istih ali sorodnih vrst. Človek je pogosto navkljub strogim higienskim ukrepom lahko mehanski prenašalec mikroorganizmov med različnimi rejami, lahko pa je tudi občasni gostitelj nekaterih povzročiteljev bolezni. Tako se lahko prenesejo na živali vrste *Salmonella*, *Campylobacter*, *Micobacterium*, *Staphylococcus*, preventivni ukrep pa je ločeno osebje, ki dela z različnimi mikrobiološkimi kategorijami živali. Mehanski prenos okužbe v rejo pa predstavlja tudi material in oprema, ki se uporablja za delo in nastanitev živali. Glede na vrsto reje moramo posebno pozornost posvečati hrani in vodi, kletkam in kirurškemu materialu tako, da omenjene artikole po potrebi steriliziramo.

RAZLOGI ZA ZAGOTAVLJANJE MIKROBIOLOŠKE STANDARDIZACIJE

Bolezni in pogin laboratorijskih živali

Pojav izbruhov različnih kužnih bolezni pri laboratorijskih živalih je eden ključnih razlogov za posvečanje pozornosti mikrobiološki kvaliteti živali. Pri laboratorijskih živalih so pogosta obolenja respiratornega in prebavnega trakta in jeter. Povzročitelji teh bolezni so virusi, mikoplazme, bakterije in paraziti (preglednica 1). Posamezne vrste povzročiteljev ali njihova kombinacija vodi do povišane obolevnosti in tudi večjega pogina živali. Različne vrste, pa tudi različni soji živali ne kažejo enake dovzetnosti za določenega povzročitelja. Okužba živali se ne pokaže vedno s kliničnimi znamenji (latentna ali subklinična okužba).

Preglednica 1: Pregled števila mikroorganizmov, ki pri različnih živalskih vrstah povzročajo bolezni.

živalska vrsta	miš	podgana	morski prašiček	kunec
mikroorganizem				
virusi	25	20	15	10
mikoplazme	3	3	2	2
bakterije	25	20	15	15
paraziti	25	35	20	25

Vpliv okužb na rezultate poskusov

Latentne okužbe poskusnih živali z različnimi mikrobi imajo lahko precejšen vpliv na rezultate poskusov, kar se je izkazalo pri uporabi SPF živali. Nekateri virusi (*Sendai* virus) znižujejo odziv B- in T-limfocitov na antigensko spodbudo, povečujejo nivo interferona in zmanjšujejo nivo C3 komponente komplementnega sistema v serumu, zato takšna okužba močno vpliva na rezultate imunoloških raziskav. Okužbe z virusi (mišji virus hepatitisa) lahko inhibirajo citotoksično aktivnost T-limfocitov, lahko delujejo zaviralno na fagocitno aktivnost, povečujejo pa tudi nivo jetrnih encimov v serumu, zato take okužbe vplivajo na rezultate raziskav pri transplantacijah. Pri poskusnih živalih je torej potrebno poznati, kateri mikroorganizmi so prisotni, ker lahko modulirajo odziv živali med poskusom.

Zoonoze

Nekateri mikroorganizmi, ki povzročajo bolezni pri laboratorijskih živalih, lahko povzročajo bolezen tudi pri človeku. Zoonoze se lahko izražajo z značilnimi kliničnimi znamenji ali pa potekajo povsem subklinično. Pri človeku lahko povzroči bolezen *Streptobacillus moniliformis*, ki se prenaša preko ugriza laboratorijskega glodavca. Na človeka se prenašajo tudi dermatofiti, kot sta *Trichophyton* sp. in *Microsporum* sp. Te glivice so lahko prisotne pri različnih vrstah sesalcev. Preko izločkov dihalnega in gastrointestinalnega trakta ter z urinom se lahko človek okuži s *Hanta* virusom, ki lahko povzroči

okužbo s smrtnim izidom. Prav tako pa so lahko vir okužb tudi živali, ki so eksperimentalno okužene s povzročitelji zoonoz, zato moramo v takih primerih z njimi ravnati posebej pazljivo.

Zagotavljanje kvalitete bioloških produktov

Nevarnost prenosa zoonoz na človeka je privedla do višjih standardov za zagotavljanje kvalitete produktov, ki izhajajo iz laboratorijskih živali. Vsa cepiva, serumi in drugi biološki produkti morajo biti varni. Dobra laboratorijska praksa mora zagotavljati popolno kontrolo nad vsemi proizvodnimi koraki, nad kakovostjo končnega produkta ter tudi nad izvorom živali, ki se uporabljajo pri njihovi produkciji. SPF živali pa se uporabljajo tudi za kontroliranje varnosti cepiv, ki med drugim mora izključiti prisotnost kontaminacije z neželenimi virusi. Princip takšnega testiranja temelji na injiciranju preiskovanega cepiva poskusni živali, nato pa sledi določanje specifičnih protiteles proti neželenim virusom.

ZAGOTAVLJANJE USTREZNEGA OKOLJA ZA RAZLIČNE MIKROBIOLOŠKE KATEGORIJE ŽIVALI

Bariere

Bariere nam zagotavljajo različne nivoje preventivnih higienskih (mikrobioloških) mer, ki so odvisne od mikrobioloških zahtev določene reje živali. Absolutna bariera (izolatorij) omogoča gojenje gnotobiotičnih živali, saj je reja popolnoma izolirana od vplivov okolja. Vse material se vnaša v izolatorij steriliziran preko razkužilne kopeli. Pri klasični SPF barieri higienske mere niso tako stroge kakor pri izolatoriju. Preventiva temelji na preprečevanju vnosa potencialno patogenih mikroorganizmov v rejo, material, ki se vnaša, pa mora biti najmanj dezinficiran. Posebna pozornost se posveča osebju, ki rokuje z živalmi. Vstopanje je dovoljeno le določenemu številu oseb, pred vstopom je obvezno tuširanje, obvezna je uporaba sterilnih oblek, rokavic in zaščitnih obraznih mask, prostori, kjer so nastanjene živali, so v nadtlaku v primerjavi z okoljem. SPF živali so pred vplivom iz okolja lahko zaščitene tudi z modificiranimi bariernimi sistemi, kot je zračna komora (Laminar Air Flow: LAF), v katero so postavljene kletke z zaščitnimi pokrovi s filtrom. Rokovanje z živalmi poteka le v zračni komori, ko se odstrani tudi zaščitni pokrov s filtrom. Kadar pa je potrebno zaščititi okolje pred mikroorganizmi, ki so prisotni pri živalih, uporabljamo reverzno klasično bariero. Pri tem se mora odpadni material sterilizirati in osebje se mora pred izstopom tuširati. Prostori so v podtlaku v primerjavi z okoljem, zrak, ki iz prostorov izhaja, mora biti filtriran do sterilnosti.

Vzdrževanje in mikrobiološka kontrola barier

Za vzdrževanje primernih mikrobioloških razmer uporabljamo sistematično čiščenje in pranje opreme, ki pomembno zmanjša število mikroorganizmov. Oprano opremo kemično ali fizikalno dezinficiramo in steriliziramo z materialu primernimi postopki in s tem močno zmanjšamo ali uničimo mikroorganizme. Učinkovitost postopkov se preverja z bakteriološko preiskavo ali z uporabi različnih indikatorjev.

Mikrobiološka kontrola laboratorijskih živali

Kontrola živali na prisotnost mikroorganizmov je zelo pomembna zlasti pri razvrščanju in ohranjanju posameznih mikrobioloških kategorij živali. Pomembno je periodično spremljanje (screening) zdravstvenega stanja živali, pri poginulih živalih je potrebno opraviti patoanatomsko in mikrobiološko analizo. Pri mikrobioloških analizah uporabljamo direktne metode (mikroskopski pregled materiala, izolacija mikroba), alternativno pa pri živih živalih lahko opravimo indirektno mikrobiološko analizo, kjer se dokazuje prisotnost specifičnih protiteles proti določenemu povzročitelju. Pri spremljanju mikrobiološke kvalitete živali se je potrebno držati programa. Tako je frekvenca spremljanja mikrobiološke kvalitete od 2 do 12-krat na leto. Prav tako je pomembno tudi število živali v vzorcu za preverjanje, ki je odvisno od posamezne situacije in se običajno giblje med 5 in 25 živali v vzorcu

(preglednica 2). Število vzorcev iz reje nam pokaže verjetnost, s katero je prisotna določena okužba v reji.

Preglednica 2: Velikost vzorca, potrebna za prepoznavanje okužbe v reji.

Odstotek okuženih živali (pojavnost)	Velikost vzorca	Izračun velikosti vzorca
5	59	$S = \frac{\log p}{\log N}$
10	29	
20	14	
30	9	S = velikost vzorca P = verjetnost napake (5 %) N = odstotek zdravih živali
40	6	
50	5	
70	3	
100	1	

UVOD

Genetski monitoring poskusnih živali je postopek, s katerim ugotavljamo pristnost (avtentičnost), izvor ali poreklo poskusnih živali. To je lahko ena od pomembnih dejavnosti vzrejnega centra poskusnih živali, posebej pa je ta vidik potrebno upoštevati pri znanstvenoraziskovalnem delu. Raziskovalci se pri načrtovanju poskusa za določeno vrsto (npr. pasmo, linijo, podlinijo ipd.) poskusnih živali odločijo iz več razlogov. Na to odločitev precej vpliva dejstvo, da imajo določene vrste svojstvene genetske in fenotipske značilnosti. Tako je potrebno že v fazi načrtovanja poskusa izbrati tiste vrste poskusnih živali, ki nam bodo pri določenem številu dale največji izplen informacij ali da se bo izbrana vrsta pri poskusu odzvala na pričakovani način in s tem prispevala h korektno kontroliranemu poskusu.

Raziskovalci, ki preučujejo določene mutacije, morajo biti glede uporabe genetsko definiranih živali še posebej pozorni. Znano je namreč, da imajo določene mutacije lahko zelo različne fenotipske učinke, če se nahajajo v različnih genetskih ozadjih (npr. ista mutacija v različnih linijah). Genetski monitoring lahko tako raziskovalcem omogoča, da preverijo genetsko strukturo poskusnih živali, kar jim na koncu zagotavlja tudi boljšo primerljivost rezultatov med laboratoriji. Principe in pomen uporabe genetsko definiranih poskusnih živali ter osnove tehnik genetskega monitoringa je potrebno poznati tudi z etičnih vidikov. Genetska variabilnost je v veliki meri odgovorna za povečanje biološke variabilnosti v poskusu. To pomeni, da bi raziskovalci, ki za poskus izberejo vrsto živali, ki ni optimalna glede na načrt poskusa, ali vrsto z neznanim poreklom, morali uporabiti večje število živali. To je v nasprotju z načelom 3R (predvsem z načelom »reduce«), kjer težimo k čim manjšemu številu živali v poskusu. Iz tega razloga sta izbira ustrezno genetsko definiranih živali in izvajanje genetskega monitoringa v vzrejnih centrih poskusnih živali utemeljena tudi z etičnega vidika.

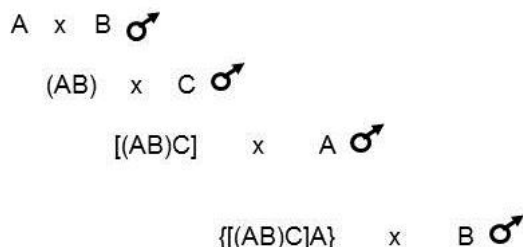
Ko uvajamo poskusne živali v svoje vzrejne ali uporabniške organizacije, je v prvem koraku najpomembnejše, da jih pridobimo od preverjenih referenčnih centrov ali raziskovalcev, ki imajo dokazljivo ustrezno raven genetskega in mikrobiološkega monitoringa. Referenčni centri vzrejajo določene vrste živali v tako imenovanih nuklearnih kolonijah, ki so med seboj fizično ločene (včasih celo v različnih objektih), kar preprečuje genetske kontaminacije zaradi nenačrtnih parjenj. Te kolonije parijo po točno določenih načrtih in sistemih križanj ter redno pregledujejo različne parametre. Vse živali, ki ne kažejo pričakovanih genetskih in fenotipskih značilnosti, so izločene. Poleg tega imajo referenčni centri dostop do bank zamrznjenih zarodkov ali spolnih celic (npr. sperme) izvornih vrst poskusnih živali, zato lahko v primeru bolezni, mutacij ipd. zopet pridobijo določeno vrsto živali s prvotnimi genetskimi in fenotipskimi značilnostmi.

Če v centru za poskusne živali tako pridobljene poskusne živali vzrejamo daljše časovno obdobje, je priporočljivo vzpostaviti genetski monitoring, s katerim lahko občasno preverjamo avtentičnost poskusnih živali v primerjavi z izhodno linijo. Genetski monitoring je še posebej pomemben v tistih primerih, kjer je možnost genetske kontaminacije večja. V isti sobi ali objektu lahko imamo na primer več različnih vrst poskusnih živali, ki so si fenotipsko zelo podobne in se lahko med seboj parijo, kar poveča možnost nenačrtnih križanj in genetskih kontaminacij. V kolikor v svojem centru nimamo namena vzrejati poskusnih živali na dolgi rok, je priporočljivo, da živali za določene poskuse in projekte sproti kupujemo od preverjenih referenčnih centrov, kjer redno izvajajo genetski monitoring in prodajajo le genetsko definirane vrste poskusnih živali. V tem prispevku bomo na kratko pregledali osnovno terminologijo in metodologijo, povezani z genetskim monitoringom poskusnih živali.

TESTIRANJE AVTENTIČNOSTI GLEDE NA VRSTO POSKUSNIH ŽIVALI

Neinbridirane (angl. »outbred«) poskusne živali so genetsko raznolike (heterogene) populacije, ki se vzrejajo z naključnim parjenjem ali drugimi sistemi parjenj, ki preprečujejo križanja v ožjem sorodstvu. Če imamo opravka z veliko populacijo, lahko uporabljamo sistem naključnega parjenja. V manjših

populacijah so za ohranjanje genetske raznolikosti učinkovitejši drugi načini parjenja, kot je načrtno parjenje med bratranci in sestričnimi ali pa rotacijski sistem križanj. Pogosto so v rabi načrtna parjenja, kjer se izogibamo parjenjem med brati in sestrami ter polbrati in polsestrami, ali uporaba tako imenovanega rotacijskega sistema križanj. Na sliki 1 je prikazan primer rotacijskega križanja z uporabo treh podpopulacij znotraj neinbridirane vrste. Kot je razvidno s slike 1, se povprečna heterozigotnost po določenem številu generacij ustali na 75 odstotkih, kar pomeni, da se ohranja večina genetske variabilnosti. Rotacijski sistem križanj je enostaven in primeren za različne vrste poskusnih živali (npr. miši, podgane, hrčki, kunci, prašiči).



Slika 1. Primer rotacijskega sistema križanja za ohranjanje genetske raznolikosti neinbridiranih poskusnih živali. Populacijo živali v tem primeru naključno razdelimo na tri podpopulacije (A, B, C) – samce iz vsake podpopulacije izmenično parimo s samicami križankami v vsaki nadaljnji generaciji.

Neinbridirane vrste lahko uporabljamo za toksikološko testiranje, izvajanje umetne selekcije na določeno lastnost, v poskusih, kjer potrebujemo visoko reproduktivne živali, ipd. Pri nekaterih vrstah poskusnih živali, kjer inbridirane linije ne obstajajo, so neinbridirane živali edini obstoječi vir. Poleg dobrih reprodukcijskih sposobnosti in preživetvene sposobnosti so neinbridirane populacije po navadi cenejše in manj zahtevne za vzrejo kot inbridirane. Njihova slaba lastnost pa je, da so genetsko in fenotipsko bolj variabilne, kar je potrebno upoštevati pri poskusu. To navadno pomeni, da mora biti za dobro napovedno moč v poskusu večje število poskusnih živali.

Kljub genetski raznolikosti tudi pri neinbridiranih vrstah izvajamo genetski monitoring. Pri tem pa v nasprotju z genetskim monitoringom inbridiranih linij ugotavljamo predvsem značilnosti populacije kot celote in nas ne zanimajo toliko lastnosti in genotip posameznih živali. Pri fenotipskih parametrih (npr. telesna masa, reprodukcijske lastnosti, anatomske značilnosti, hematološki profili) nas zanimajo povprečja in odkloni preučevane populacije od značilnih vrednosti za določeno vrsto. Fenotipske podatke, značilne za inbridirane in neinbridirane mišje linije, lahko poiščemo v bazi fenomskih podatkov (angl. Mouse phenome database, <http://phenome.jax.org/>), za druge poskusne živali pa iz znanstvene in strokovne literature, vzrejnih centrov, kjer smo živali kupili ipd. Genetsko strukturo neinbridiranih poskusnih živali poskušamo opisati predvsem s številom in frekvencami (pogostnostjo) alelov na posameznih lokusih (lokus je neko mesto na kromosomu) ali genih. Z uporabo novejših metod molekularne genetike lahko za neinbridirane populacije natančno ovrednotimo tudi stopnjo heterozigotnosti (stanje, kjer ima žival na lokusu dva različna alela), ki je tudi eden od pomembnih parametrov za prepoznavanje določene vrste neinbridiranih poskusnih živali. Primeri neinbridiranih vrst poskusnih živali, ki se pogosto uporabljajo, so pri miših (NMRI, OF, CD-1, Swiss-Webster), pri podganah (Sprague-Dawley), neinbridirane so praviloma tudi populacije psov, mačk, kuncev, morskih prašičkov, kokoši in drugih domačih živali.

Inbridirane linije poskusnih živali so genetsko homogene populacije, ki so bile razvite z večgeneracijskim parjenjem v ožjem sorodstvu. Inbridirane linije pridobimo tako, da izhajamo iz enega izhodnega para neinbridirane linije in izvajamo zaporedno parjenje med brati in sestrami (po navadi uporabljamo to vrsto parjenja) ali parjenje staršev in potomcev (uporabljamo redkeje) najmanj 20 generacij. Cilj takega sistema parjenja v ožjem sorodstvu je, da poskušamo znižati genetsko variabilnost znotraj inbridirane linije in jo obenem fiksirati (narediti homozigotno) za določene gene in posledično lastnosti. Potrebno je poudariti, da je tudi po 20 generacijah parjenja v ožjem sorodstvu (brat-sestra, starši-potomci) še vedno nekaj ostanka genetske variabilnosti, ki lahko vodi do nastanka podlinij. V razvoj podlinij lahko vodijo tudi spontane *de novo* mutacije – včasih lahko te odkrijemo prav z genetskim monitoringom. Več

informacij o nomenklaturi inbridiranih linij (miši) je dostopnih v strokovnem članku (Perše in Rozman, 2006) ter na spletnem naslovu (<http://www.informatics.jax.org/mgi/home/nomen/>).

Kljub temu da so inbridirane linije poskusnih živali genetsko homogene (imajo najmanjšo možno mero genetske variabilnosti), so lahko še vedno fenotipsko variabilne. Omenjena variabilnost pogosto izhaja iz dejstva, da so te linije bolj občutljive na okoljske dejavnike kot neinbridirane in lahko za določene lastnosti (npr. imunske lastnosti) kažejo skoraj enako veliko fenotipsko variabilnost kot neinbridirane. Druge slabosti inbridiranih linij so slabše reprodukcijske in preživitvene sposobnosti ter neprimernost za izvajanje umetne selekcije ipd. Vseeno pa prednosti inbridiranih linij navadno prevladajo nad slabostmi. Te linije so namreč znotraj populacije izogene (živali so si med seboj genetsko identične), vsi lokusi so homozigotni, genetska struktura linije je stabilna in raziskana, med osebki obstaja histokompatibilnost, vsaka inbridirana vrsta ima določene (ponovljive) specifične fiziološke lastnosti, dobro so raziskani tudi učinki posameznih mutacij. Zaradi vseh naštetih pozitivnih lastnosti so rezultati med laboratoriji bolj primerljivi, zato se raziskovalci raje zatekajo k uporabi inbridiranih kot neinbridiranih poskusnih živali.

Pri genetskem monitoringu za inbridirane vrste so poleg še nekaterih enostavnih morfoloških označevalcev (npr. barva dlake) danes skoraj izključno v rabi genetski označevalci na ravni DNA. Priporočljivo je, da imamo v isti sobi inbridirane linije, ki se lahko ločijo po barvi dlake, da na ta način lažje preprečujemo nenačrtna parjenja. Vendar se za uspešno preprečevanje nenačrtnih parjenj ne moremo zanašati izključno le na barvo dlake in druge morfološke označevalce (npr. telesna masa, anatomske posebnosti). Dedovanje barve dlake je namreč pri sesalcih precej zapleteno, saj na to lastnost vpliva večje število genov, vsak z različnimi aleli in kompleksnimi interakcijami med njimi. Tako je lahko nenačrtni križanec po barvi dlake enak eni od starševskih linij in lahko tovrstno kontaminacijo odkrijemo le z genetskim monitoringom (prikazano spodaj). Genetski monitoring je še bolj potreben v primerih, ko imamo v isti sobi vrste živali, ki so si fenotipsko zelo podobne. Po zunanjem videzu je na primer nemogoče ločiti liniji miši C57BL/10 in C57BL/6. V tem primeru je edina možnost za testiranje avtentičnosti redni genetski monitoring. Ker so inbridirane linije genetsko identične, lahko avtentičnost linij občasno preverimo s transplantacijami (npr. kože). Če so osebki znotraj linije ostali genetsko homogeni, potem ne pričakujemo, da bi pri transplantacijah prišlo do zavračanja presadkov. Ta metoda je torej lahko učinkovita tudi pri odkrivanju novonastale genetske raznolikosti znotraj linij, vendar se zaradi učinkovitosti metode genetskih označevalcev pristop genetskega monitoringa s transplantacijami v zadnjem času opušta.

Ker so inbridirane vrste homozigotne za celoten genom, je relativno enostavno poiskati lokuse, ki se med inbridiranimi linijami razlikujejo. Pri miših že poznamo zaporedja celotnih genomov 17 linij miši (Keane s sod. 2011), za večino ostalih živalskih vrst, uporabljenih za poskuse, pa so poznani vsaj referenčni genomi (<http://www.ensembl.org/index.html>). Za ugotavljanje avtentičnosti inbridiranih vrst v manjših vzrejnih centrih je dovolj, da določimo 5 do 6 genetskih označevalcev, ki so nevezani (ležijo na različnih kromosomih), in s takim minimalnim nizom poskušamo ugotavljati možno genetsko kontaminacijo. Na sliki 2 je prikazan primer genetskega monitoringa za neinbridirano vrsto poskusnih živali. Dedovanje alelov pri potomcu (sin 11344) se na vseh osmih lokusih ujema z genotipi staršev, zato lahko zaključimo, da v tem rodovniku ni prišlo do nenačrtnih parjenj oziroma genetske kontaminacije.

OČE 52249								
MIKROSATELITNI LOKUSI								
1	2	3	4	5	6	7	8	
10	54	34	67	38	14	57	41	
19	50	38	67	27	14	59	30	

MATI 190659								
MIKROSATELITNI LOKUSI								
1	2	3	4	5	6	7	8	
10	52	36	61	36	8	55	30	
15	49	34	67	24	8	59	30	

SIN 11344								
MIKROSATELITNI LOKUSI								
1	2	3	4	5	6	7	8	
10	54	34	67	38	14	57	41	
15	49	34	67	24	8	59	30	

Slika 2: Primer genetskega monitoringa z uporabo osmih mikrosatelitnih lokusov (1–8). Aleli so prikazani kot število dinukleotidnih ponovitev.

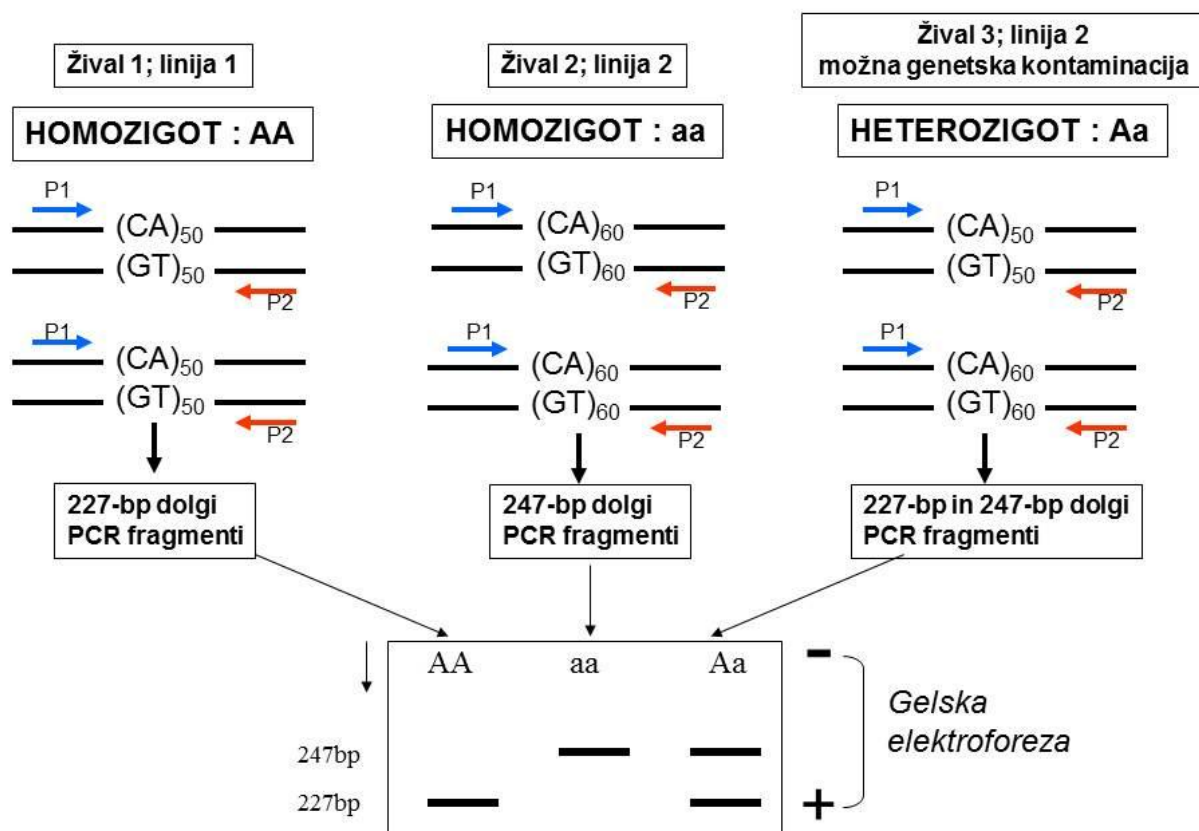
Izbrane nize šestih (ali več) genetskih označevalcev je potrebno menjati vsako generacijo. Cilj je, da na vsake 3 do 4 generacije pregledamo vsaj 2 genetska označevalca na vsak kromosom. S tovrstnim genetskim monitoringom, beleženjem fenotipskih podatkov (telesna masa, reprodukcija, barva dlake) ter občasnimi testi kožnih presadkov imamo veliko možnost določanja kontaminacij in izbire staršev, ki po genotipu in fenotipu ustrezajo značilnostim določene populacije poskusnih živali.

METODOLOGIJA GENETSKEGA MONITORINGA Z GENETSKIMI (DNA) OZNAČEVALCI

Obstajajo različne metode genetskega monitoringa pri inbridiranih linijah, ki so podrobneje opisane drugje (Perše, Horvat, Rozman, 2007). V tem prispevku bomo posebej predstavili le dve metodi, ki sta najpogostejše v uporabi za rutinski genetski monitoring.

Mikrosateliti. Pri genetskem monitoringu večinoma uporabljamo teste, razvite na osnovi razlik v nukleotidnem zaporedju DNA. Pogosto uporabljeni genetski označevalci so tako imenovani mikrosateliti. To so dinukleotidne ponovitve v DNA zaporedju, npr. (TG)_n, ki so številčne in naključno razporejene po celotnem genomu. Te ponovitve so polimorfne glede na število dinukleotidnih ponovitev. Število teh ponovitev na določenem mikrosatelitnem lokusu se zelo razlikuje med osebki znotraj vrst, zato so zelo primerni označevalci za genetski monitoring. Vsak mikrosatelitni lokus lahko pomnožimo v tako imenovani verižni reakciji s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction, PCR). V tej reakciji uporabljamo oligonukleotidne začetnike, ki ležijo na obeh koncih dinukleotidne ponovitve. Ker se aleli na določenem mikrosatelitnem lokusu med seboj razlikujejo v številu dinukleotidnih ponovitev, lahko v PCR reakciji dobimo produkte, ki imajo različno dolžino. Te različno dolge produkte lahko razslojimo z različnimi tehnikami. Na sliki 3 sta prikazana metoda gelske elektroforeze in test za tri živali, prva je iz linije 1, drugi dve sta iz linije 2. Linija 1 je homozigotna (ima dva alela AA), ki v PCR reakciji pomnožita 227-bp dolg PCR produkt, medtem ko je linija 2 na mikrosatelitnem lokusu A homozigotna za 247-bp dolg PCR produkt (dva alela aa). Žival 1 in 2 ustrezata pričakovanemu vzorcu standarda, medtem ko žival 3 nosi oba alela, A in a, čeprav izhaja iz linije 2. To kaže, da je v prejšnji generaciji morda prišlo do nenačrtnega križanja med linijo 1 in 2, zato v takem primeru živali 3 ne bi uporabljali naprej za reprodukcijo. Pri genetskem monitoringu se ne opiramo le na rezultate enega samega lokusa, ampak naključno izberemo 5 do 6 lokusov, ki ležijo na različnih kromosomih.

Podatki o tem, kateri mikrosateliti med vrstami poskusnih živali so polimorfni, so danes dostopni v objavljeni literaturi ali – kot je za posamezno živalsko vrsto vse bolj v rabi – v bazah podatkov na spletu (nekaj naslovov je navedenih v seznamu literature).



Slika 3. Prikaz genetskega monitoringa z mikrosatelitnimi genetskimi označevalci. Žival št. 3 na desni je iz linije 2, vendar je za lokus A heterozigotna, kar kaže na možno kontaminacijo linije 2 z linijo 1 – take živali ne bi uporabljali naprej za reprodukcijo; P1 in P2 so kratki oligonukleotidni začetniki, ki ležijo na obeh straneh mikrosatelita (lokusa A).

Genetski označevalci SNP. V zadnjem času, ko imamo na razpolago zaporedja nukleotidov celotnih genomov pri vse večjem številu živalskih vrst, se v sodobni genomiki vse bolj uveljavljajo tako imenovani polimorfizmi enega samega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphisms ali označevalci SNP). Gre za točkovne mutacije na mestih v genomu, kjer se osebki v populaciji v povprečju pogosteje razlikujejo (so visoko polimorfni). Poleg te prednosti so označevalci SNP najštevilčnejši, prav tako pa je možno avtomatizirati večino metodološkega postopka. Tako so na primer za laboratorijske miši razvili sistem genetskega monitoringa s SNP označevalci, pri katerem lahko z izbranimi 28 označevalci SNP razlikujemo katerokoli od sedaj znanih 300 inbridiranih linij ali vrst miši, izpeljanih iz teh linij. Vzrejni centri, ki imajo manjše število vrst, si lahko ustrezno zmanjšajo število potrebnih SNP označevalcev za učinkovit genetski monitoring populacij v svojem centru. Predvidevamo lahko, da se bo v bližnji prihodnosti genetski monitoring pri vseh vrstah poskusnih živali izvajal večinoma s pomočjo SNP genetskih označevalcev. V letu 2009 je The Jackson Laboratory že začel ponujati mikromrežo označevalcev SNP (<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/512/512b.html>), imenovano *Mouse Diversity Genotyping Array*, s pomočjo katere lahko sočasno genotipiziramo 600.000 lokusov SNP, obenem pa vsebuje prek 900.000 sond za določanje variabilnosti števila kopij določenih genomskega odsekov. Čeprav je mikromreža v prvi vrsti namenjena raziskavam kartiranja kompleksnih lastnosti, je obenem tudi odlično orodje za natančni genetski monitoring linij miši. Od leta 2012 je na voljo že izpopolnjena mikromreža za genetski monitoring mišjih linij (*The Mouse Universal Genotyping Array* – MUGA). Vzrejni centri oziroma raziskovalci lahko pri podjetjih (npr. <http://www.neogen.com>) naročijo genetski monitoring kot servisno uslugo in ni potrebno, da genetski

monitoring izvajajo sami v svojem centru. Primer genetskega monitoringa z označevalci SNP je prikazan na sliki 4. Podobna orodja lahko kmalu pričakujemo tudi za druge vrste laboratorijskih poskusnih živali.

SNP ID (dbSNP Build 128)	Map Position (NCBI Build 37)	r s orien	Gene : dbSNP Function Class	Assays (ss)	Variation Type	129S1/SvJm	129X1/SvJ	A/J	HR/J	BALB/cByJ	BALB/cJ	C3H/HeJ	C57BL/6J	C57L/J	C58/J	CAST/EiJ	CZECH1/EiJ	DBA/2J	FVB/NJ	MOLF/EiJ	NOD/ShiLtJ	NZB/BINJ
rs13489041 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66486638	f	Tlr4 : 1980 bp upstream of	2	SNP	C	C	C	C	C	C	C	C			G		C	C	G	C	C
rs13489042 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66486653	f	Tlr4 : 1965 bp upstream of	2	SNP		T	C	T	C	C	T	T			T		T				T
rs13498451 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66486659	f	Tlr4 : 1959 bp upstream of	1	SNP		T	T	T	T	T	T	T			C		T				T
rs13489043 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66486720	f	Tlr4 : 1898 bp upstream of	2	SNP	G	G	G	G	G	G	G	G			C		G	G	C	G	G
rs27883180 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66487020	f	Tlr4 : Locus-Region (upstream)	1	SNP	A		A	A	A		A				A		A	A	A	A	
rs27883179 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66487329	f	Tlr4 : Locus-Region (upstream)	1	SNP	A			A							A		A	A			
rs13498452 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66487337	f	Tlr4 : Locus-Region (upstream)	3	SNP	A	A	G	A	G	G	A	A			G		A	A	G	A	A
rs27883178 MPQ dbSNP MGI SNP Detail	Chr4:66487429	f	Tlr4 : Locus-Region (upstream)	1	SNP	A		A	A	A		A				A		A	A	A	A	

Slika 4. Prikaz genetskega monitoringa s SNP genetskimi označevalci. Prikazan je zelo majhen odsek genoma na mišjem kromosomu 4, ki prikazuje variabilnost na SNP pri različnih linijah miši (prirejena slika s http://www.informatics.jax.org/searches/snp_report.cgi). Na osnovi teh baz podatkov lahko zelo učinkovito ločimo različne linije med seboj in hitro ugotovimo možno genetsko kontaminacijo.

ZAKLJUČEK

Pri načrtovanju poskusa je potrebno upoštevati uporabo genetsko definiranih živali, saj lahko s tem bistveno vplivamo na učinkovitost poskusa in zmanjšamo število živali. Če na določeni vrsti poskusnih živali poskus izvajamo enkratno ali občasno, je priporočljivo, da poskusne živali kupimo od registriranih referenčnih vzrejnih centrov, ki poleg vseh ostalih dejavnosti (zdravstveni monitoring itd.) redno izvajajo tudi genetski monitoring. Če določeno vrsto poskusnih živali naprej daljši čas vzrejamo v svojem centru, moramo nujno izvajati tudi genetski monitoring. Pogostost izvajanja monitoringa je odvisna od vrste živali (neinbridirane, inbridirane) ter od stopnje fizične izolacije posameznih linij (ali je določena vrsta izolirana v svoji sobi ali je v sobi oziroma objektu več podobnih vrst ipd.). Danes so uveljavljene metode genetskega monitoringa razvite na osnovi genetskih (DNA) označevalcev, s katerimi preverjamo genetsko strukturo določene vrste poskusnih živali. Z genetskim monitoringom torej preverjamo avtentičnost izbrane vrste poskusnih živali in s tem povečamo učinkovitost poskusa, zmanjšamo rabo poskusnih živali in zagotovimo primerljivost rezultatov med laboratoriji.

LITERATURA

Članki, priročniki/knjige:

1. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on Genetic Background in Mice. Neuron 1997; 19: 755–9.
2. Benavides F. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. Lab Anim 2001; 35: 157–62.
3. Committee on rodents of laboratory animal resources. Rodents: laboratory animal management. Washington: National Academy Press, 1996.
4. Dagnaes - Hansen F. Laboratory animal genetics and genetic monitoring. In: Svendsen P, Hau J, eds. Handbook of laboratory animal science: selection and handling of animals in biomedical research. Vol I. Boca Raton: CRC Press, 1994: 89–125.
5. Festing FMW. Laboratory animal genetics and genetic quality control. In: Hau J, van Hoosier GL, eds. Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices. Vol I. Boca Raton: CRC Press, 2003: 173–205.

6. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 2011; 477(7364): 289–94.
7. Laboratory animal pocket references series – nine volume set: The laboratory nonhuman primate; The laboratory rat; The laboratory rabbit; The laboratory hamster and gerbil, The laboratory mouse, The laboratory Guinea pig; The laboratory small ruminant; The laboratory swine; The laboratory cat. Boca Raton: CRC Press, 1997–2012.
8. Perše M, Rozman D. Značilnosti in pravila poimenovanja inbridiranih linij miši. *Vet Nov* 2006; 32(1/2): 23–9.
9. Perše M, Horvat S, Rozman D. Genetski nadzor inbridiranih linij. *Acta Agric Slov* 2007; 90(2): 69–83.
10. Petkov PM, Cassell MA, Saegent EE, et al. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 2004; 83: 902–11.
11. Wood PA, Hamm DA, Cartner SC, Lindsey JR. Simple sequence length polymorphism analysis of mice for genetic monitoring. *Contemp Topics Lab Anim Sci* 1996; 35: 60–2.

Nekatere povezave:

- Inbridirane linije miši in podgan:
http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi
- Podgane – genetski označevalci:
<http://ratmap.gen.gu.se>
- Miši – fenotipi:
<http://aretha.jax.org/pub/cgi/phenome/mpd.cgi?rt=docs/home>
- Miši – nomenklatura:
<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/>
- Miši – genetski označevalci:
http://www.informatics.jax.org/menus/strain_menu.shtml
- Miši – SNP mikromreža za genetski monitoring:
<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/512/512b.html>
- Genomske informacije pri različnih vrstah:
<http://www.ensembl.org/index.html>
- Genomske informacije pri domačih živalih:
<http://www.arkgenomics.org/>

UVOD

Metode transgeneze omogočajo, da pridobimo živali z želeno spremembo genoma, ki se deduje. Te metode so se najprej uveljavile pri enostavnejših bioloških sistemih, kasneje pa vse bolj tudi pri višjih organizmih. Odmevnost in pomembnost tega področja potrjuje tudi podelitev Nobelove nagrade za medicino za leto 2007 profesorjem M. J. Evansu, M. R. Cappechiju in O. Smithiesu za razvoj metod transgeneze pri živalih z izničnimi (angl. knockout) geni. Tematika prispevka, povezana s transgenezo živali, bo osredotočena predvsem na poskusne živali. Omejili se bomo na razlago osnovnih metod transgeneze poskusnih živali (predvsem pri sesalcih) ter podali nekaj primerov uporabe tehnologije transgeneze. Ta prispevek je napisan na osnovi dveh strokovnih člankov (Horvat 2008a, Horvat 2008b), kjer lahko bralci dobijo še druge informacije, ki niso zajete v tem prispevku. Boljše poznavanje osnov tehnologije transgeneze in nekaterih pomembnih dejavnikov lahko izvajalcem in vodjem poskusov omogoča boljše načrtovanje in izvajanje poskusov ter bolj etično rabo transgenih poskusnih živali.

Zelo široka definicija opredeljuje transgene živali kot organizme, ki smo jim dednino (DNA) trajno spremenili na »umeten« način, ki se ne bi mogel zgoditi spontano v naravi. Čeprav ta definicija razmeroma ostro ločuje med »naravnimi« in »umetnimi« posegi, je treba poudariti, da se spontane mutacije dednine v naravi stalno dogajajo in so pomemben vir genetske variabilnosti (spremenljivosti), na katero lahko potem deluje naravna selekcija. Ožja definicija transgeno žival opredeljuje kot organizem, pri katerem smo z vnosom »tuje« DNA (to je katerikoli odsek DNA iz iste živalske vrste ali drugih vrst) nekje v genomu spremenili zaporedje nukleotidov.

Obstajajo trije osnovni načini pridobivanja transgenih živali – metoda dodajanja genov z mikroinjiciranjem DNA v zgodnji zarodek ali s pomočjo ekombinantnih virusov ter metodi izničenja ali mutiranja genov z vnosom genskih sprememb v embrionalne matične celice (angl. embryonic stem (ES) cells) ali v somatske (odrasle) celice (Pinkert, 2002). Pri vseh omenjenih metodah je potrebno v laboratoriju najprej pripraviti tako imenovane transgene konstrukte, ki se po sestavi elementov med seboj razlikujejo predvsem glede na izbrano metodo in namen raziskave. Transgeni konstrukt se nato z različnimi načini uvede v sprejemno celico, ki ji želimo spremeniti genom. Sledijo postopki za identifikacijo gensko spremenjenih celic in reproduktivne manipulacije (na primer gojenje zgodnjih zarodkov, prenos zarodkov v nadomestne matere in podobno) ter ustrezna parjenja, kar na koncu privede do razvoja transgene živali.

DODAJANJE GENOV V GENOM ŽIVALI

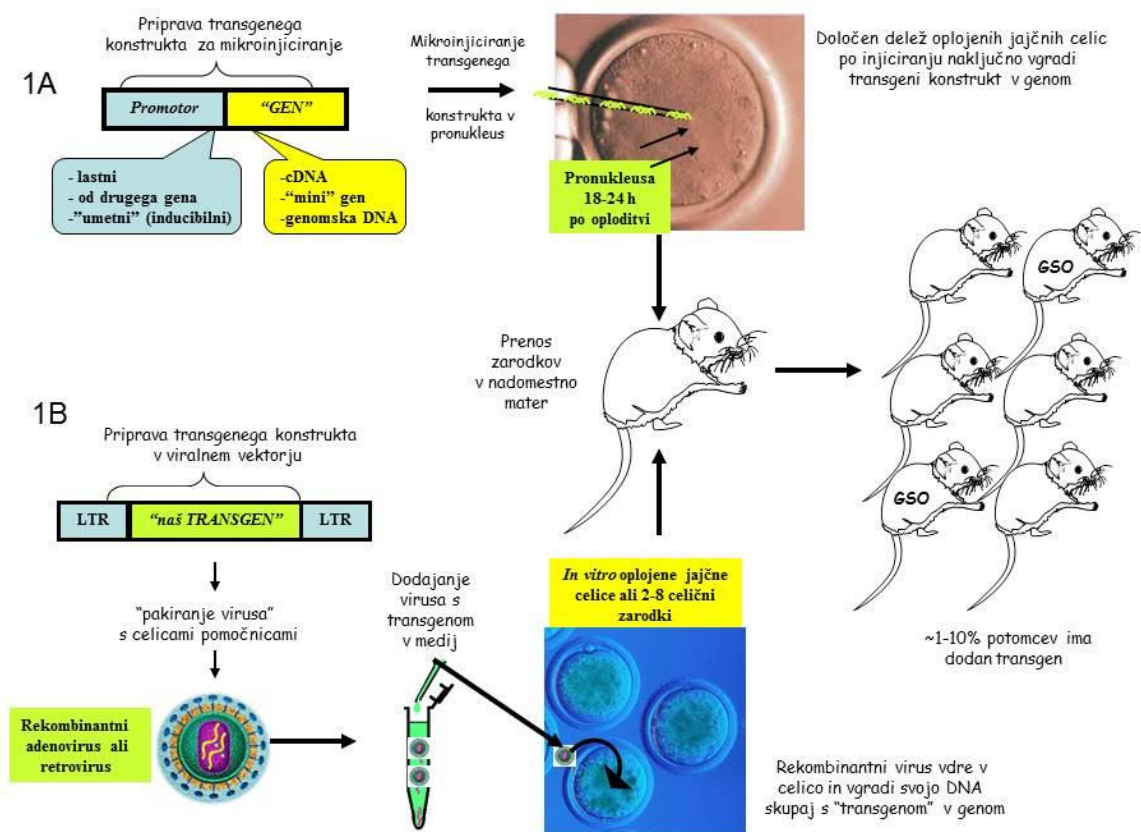
V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je razvoj metode mikroinjiciranja DNA v zgodnji zarodek povzročil pravo revolucijo glede uporabe transgeneze pri živalih. Prva transgena žival, razvita s to metodo, je bila laboratorijska miš, vendar so to tehniko kmalu uspešno uporabili tudi pri drugih sesalcih (na primer govedu, prašičih, ovcah, kozah), pri pticah (predvsem kokoših), ribah ter tudi pri vinski mušici in drugih žuželkah. Pri metodi mikroinjiciranja DNA transgeni konstrukt vbrizgamo v pronukleus oplojene jajčne celice (navadno je to jedro, ki izvira iz semenčice), pri čemer se pri določenem deležu injiciranih celic transgeni konstrukt vgradi v genom živali (Slika 1A). Zgodnje zarodke nato prenesemo v tako imenovane nadomestne matere, ki donosijo potencialno transgeno potomstvo. Rojene potomce pregledamo z molekularno-biološkimi tehnikami (Horvat s sod., 1993), pri čemer opazujemo, ali se je vneseni transgeni konstrukt uspešno integriral v DNA in ali se tudi pri transgenem potomcu izraža v pričakovanih tkivih ali razvojnih obdobjih. Dodana DNA postane

sestavni del kromosoma pri gensko spremenjeni živali in se kot ostali geni na tem kromosomu deduje naprej na potomstvo. S to metodo lahko večinoma samo dodajamo določene gene oziroma druge genomske elemente, ki se navadno vgradijo v naključna mesta v genomu živali.

Prav zadnje dejstvo – naključna integracija dodanega gena – je pri tej tehniki velik problem. Dodani gen se namreč lahko vgradi v del genoma, ki se sicer ne izraža, in tako tudi dodani gen pri transgeni živali ostane neaktiven (imenovan tudi pozicijski učinek). To lahko pomeni, da se transgeni vključek ne prepisuje v RNA in ne prevaja v protein. V tem primeru ne moremo preverjati učinka dodanega gena, ker se, kljub temu da je vgrajen v genom, sam gen ne izraža. V nasprotnem primeru se transgeni konstrukt lahko vgradi v del genoma, ki pospeši izražanje ali povzroči, da se transgen izraža v napačnem tkivu. Metoda mikroinjiciranja omogoča predvsem dodajanje genov oziroma genskih elementov v živalski genom. Vendar so raziskovalci s tehniko mikroinjiciranja pred kratkim uspeli izvesti tudi ciljno spreminjanje genoma, ki omogoča, da izničimo vlogo točno določenega gena. To tehnologijo še razvijajo, zato je treba na potrditev rezultatov in na njeno primernost za širšo uporabo še počakati.

Čeprav je pri sesalcih najbolj razširjena metoda dodajanja genov z mikroinjiciranjem, obstaja tudi metoda, kjer prenos transgenega konstrukta opravijo oslavljeni in prirejeni rekombinantni virusi (Slika 1B). Tako lahko razvijemo transgene konstrukte na podlagi rekombinantnih adenovirusov (rAd) ali retrovirusov (rRv), jih dodamo v medij, kjer se nahajajo oplojene jajčne celice ali zgodnji zarodki, in pustimo, da s svojimi genskimi elementi sami izvedejo prodor v celico in vnesejo DNA v genom. Pozitivne lastnosti te metode so v enostavnosti (ni »ročnega« mikroinjiciranja), učinkovitosti (veliko zgodnjih zarodkov lahko rekombinantnim virusom izpostavimo naenkrat) in dejstvu, da se navadno vgradi samo ena kopija viralnega-transgenega konstrukta. Zadnja lastnost odpravi težave, povezane z integracijo večjega števila kopij, ki so pri metodi mikroinjiciranja pogoste. Negativna lastnost je, da je tu mogoče vgraditi le razmeroma kratek genski vključek (približno 7000 baznih parov (bp) pri rAd, približno 14.000 baznih parov pri rRv), pri rRv obstaja tudi možnost rekombinacij z endogenimi retrovirusi. Slaba stran naštetih klasičnih viralnih vektorjev je tudi dejstvo, da je z njimi mogoče samo dodajati gene. V zadnjem času so sicer uspeli razviti tudi različice retroviralnih vektorjev, ki kombinirajo nekatere lastnosti klasičnih viralnih vektorjev in metodologije embrionalnih matičnih celic (glej v nadaljevanju). S temi dopolnitvami je tudi s to tehniko možno učinkovito izničiti gene samo v določenih tkivih ali določenih časovnih obdobjih (Schnutgen s sod., 2005).

Z metodami dodajanja genov v genom živali lahko uspešno preučujemo predvsem učinke prekomernega izražanja genov ali izražanja neke oblike (mutacije) gena. Živalski modeli, razviti s temi metodami, so zelo primerni za preučevanje genskih bolezni pri človeku, kjer je dovolj že prisotnost enega samega mutiranega alela (dominantne genske bolezni). Te živali lahko namreč imajo oba svoja funkcionalna alela in dodani mutirani alel (vgrajen nekje naključno v genomu), ki lahko povzroči določeno bolezen. Vendar so številne genske bolezni in fenotipi tudi recesivni, kar pomeni, da so prizadeti osebkii nosilci dveh okvarjenih alelov. V tem primeru so heterozigotni osebkii, ki imajo po en funkcionalni in en okvarjeni alel, fenotipsko normalni, saj izražanje enega funkcionalnega alela zadostuje za izvajanje njegove vloge. Posamezni koraki dveh glavnih pristopov dodajanja genov v genom živali so prikazani na sliki 1.

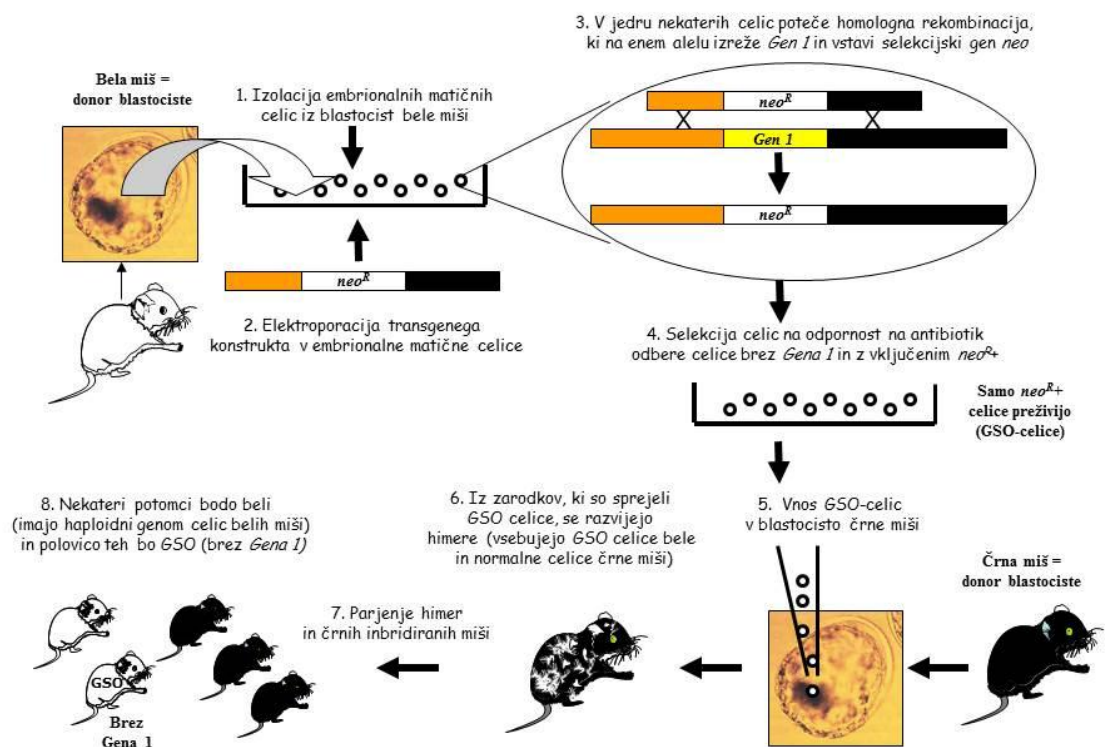


Slika 1: Dodajanje genov v genom živali. 1A Metoda mikroinjiciranja: v laboratoriju pripravimo transgeni konstrukt, ki je navadno sestavljen iz regulatornih elementov (promotorja z ojačevalnim zaporedjem (angl. enhancer) ali brez njega) in »genskega« dela, ki navadno vsebuje kodirajoče zaporedje. Transgeni konstrukt se s tanko iglo injicira v pronukleus oplojenega jajčeca, kjer se pri določenem deležu injiciranih jajčec naključno vgradi v genom živali. Zgodnje zarodke, ki zrastejo iz teh injiciranih oplojenih jajčec, prenesemo v nadomestno mater, ki lahko donosi gensko spremenjeno (GSO) potomstvo (približno 1 do 10 odstotkov rojenih potomcev). **1B Metoda viralnega prenosa:** transgeni konstrukt je tu sestavljen iz genskih elementov, ki so vgrajeni v adenoviralnem ali retroviralnem vektorju. Rekombinantne viruse dodamo v medij z oplojenimi jajčnimi celicami, ki preko svojih viralnih proteinov vdrejo v celico in vgradijo svojo DNA v genom. Podobno kot pri metodi, opisani na sliki 1A, zgodnje zarodke prenesemo v nadomestno mater. Pričakujemo lahko določen delež transgenega potomstva.

ODSTRANITEV GENOV ALI GENSKIH ELEMENTOV IZ GENOMA ŽIVALI: METODA Z EMBRIONALNIMI MATIČNIMI CELICAMI

Embrionalne matične celice so znanstveniki najprej izolirali iz zgodnjih zarodkov (blastocist) določenih linij laboratorijskih miši in uspeli ustvariti najustreznejše razmere za gojenje v celični kulturi (*in vitro*). Te celice lahko tudi po gojenju v celični kulturi in vnosu genskih sprememb ohranijo pluripotentno stanje, kar pomeni, da so še vedno sposobne razvoja v več vrst celic in tkiv, tudi zarodnih spolnih celic. Ta metoda nudi možnost spreminjanja določenega odseka na molekuli DNA (lokusa), ki poteka preko procesa homologne rekombinacije, v katerem se izmenjajo homologni odseki nukleotidnega zaporedja med transgenim konstruktom in ciljnim lokusom. Tako lahko s to metodo poleg dodajanja DNA dosežemo tudi odstranitev (izničenje) določenega lokusa ali pa na točno določenem mestu v DNA vnesemo poljubno mutacijo (na primer poljubno zamenjavo nukleotida).

Znanstveniki v laboratoriju pripravijo transgeni konstrukt (Slika 2), ki navadno vsebuje dva odseka DNA, ki sta homologna (enaka po zaporedju DNA) vsak svojemu odseku ciljnega gena, med njima pa vgradijo na primer gen za odpornost na neko kemikalijo (seleksijski gen). Transgeni konstrukt nato z elektroporacijo vnesejo v embrionalne matične celice. Homologni odseki transgenega konstruktta prepoznajo ustrezne homologne odseke v genomu in privedejo transgeni konstrukt na ciljno mesto v le-tem. V zelo majhnem odstotku celic se zgodi tako imenovana »homologna rekombinacija«, ki izmenja transgeni konstrukt s ciljnim odsekom genoma. Tako lahko na točno določenem mestu naredimo želeno mutacijo in hkrati vgradimo tudi omenjeni seleksijski gen. Ta nam omogoča, da z enostavnim dodatkom antibiotika v celično kulturo embrionalnih matičnih celic odberemo samo tiste celice, pri katerih je prišlo do vgradnje tega seleksijskega gena in tako potencialno tudi do ciljne mutacije. Odbrane gensko spremenjene embrionalne matične celice nato prenesemo nazaj v zgodnji sprejemni zarodek, kjer se lahko vgradijo v rastoči zarodek in prispevajo k razvoju različnih celičnih tipov, tudi spolnih celic. Tak zarodek imenujemo himera, saj ga sestavljajo celice dveh (po genotipu) različnih organizmov, pri tem pa določeni delež celic izvira iz gensko spremenjenih embrionalnih matičnih celic. Take potencialno himerne zarodke prenesemo v nadomestno mater in lahko tako v prvi generaciji pridobimo določen delež himernih živali. S parjenjem himer z živalmi divjega tipa lahko dobimo heterozigotne potomce (imajo en funkcionalni in en gensko spremenjeni alel v vseh celicah). S parjenjem teh heterozigotov lahko v naslednji generaciji pričakujemo 25 odstotkov homozigotnih osebkov – pri njih pa ima prav vsaka celica po dva alela z želeno gensko spremembo. Če smo na primer vnesli gen z izničenjo vlogo (angl. knockout), lahko pri takih homozigotih preučujemo fenotip oziroma učinek odsotnosti nekega gena.

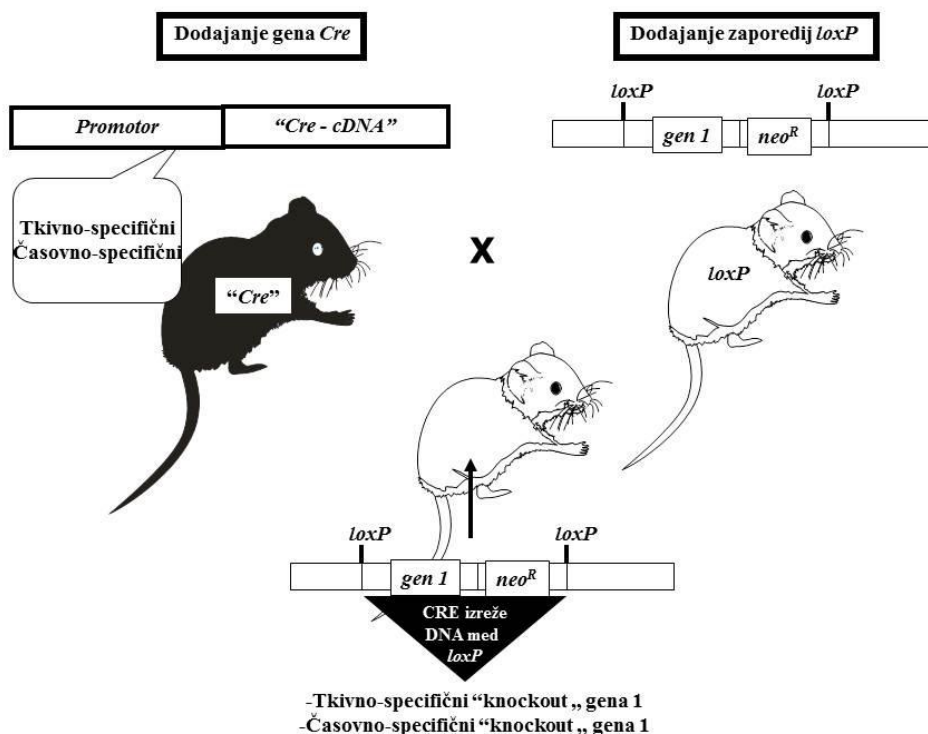


Slika 2: Odstranitev (angl. knockout) genov iz genoma z metodo embrionalnih matičnih celic. Embrionalne matične celice v prikazanem primeru izoliramo iz zgodnjih zarodkov rjave miši. Transgeni konstrukt navadno vsebuje dva dela, ki sta homologna ciljnemu genu, in izbrani seleksijski gen (na sliki 2 je prikazan gen za odpornost proti neomicinu). Z elektroporacijo vneseemo transgeni konstrukt v embrionalne matične celice in z dodatkom neomicina v medij odberemo samo tiste embrionalne matične celice, ki so vgradile transgeni konstrukt z genom za odpornost proti neomicinu in hkrati izrezale del ciljnega gena (celice GSO). Te embrionalne matične celice vnesemo nazaj v zgodnji zarodek sprejemne miši (v našem primeru zarodek črne miši), tega pa v nadomestno mater.

Med potomstvom pričakujemo določen delež himer – živali, ki vsebujejo celice gensko spremenjenih celic, izvirajočih iz rjave miši, in normalnih celic črnih miši. Te živali zlahka prepoznamo, saj imajo črnorjave lise na dlaki. Himere parimo z normalnimi črnimi mišmi in v naslednji generaciji lahko dobimo heterozigote, ki imajo na enem alelu izničen gen.

Dodatna različica te metode nam celo omogoča, da gensko spremembo omejimo le na določeno tkivo ali razvojno obdobje živali, kar imenujemo pogojna transgeneza (angl. conditional transgenesis). Ta metoda je še posebej primerna za študij vloge tako imenovanih esencialnih genov. Če pri njih naredimo klasični »knockout« in so vse celice organizma brez funkcije tega gena, se tak osebek pogosto razvije le do določenega razvojnega obdobja in lahko zamre že kot zarodek (Motaln s sod., 2005). S pogojno transgenezo pa lahko funkcijo takih genov omejimo le na določeno tkivo ali razvojno obdobje, zaradi česar osebkci lahko preživijo.

Pogosto uporabljen sistem pri pogojni transgenezi živali je sistem Cre-lox. Odkrit je bil pri bakteriofagu P1, ki ga uporablja pri replikaciji svoje DNA. Danes se ta sistem rekombinacije uporablja za manipulacije genoma v celičnih kulturah (*in vitro*) in različnih modelnih organizmih (*in vivo*). Sistem je relativno enostaven, saj za delovanje potrebujemo dve komponenti, rekombinazo CRE in nukleotidna zaporedja loxP. Rekombinaza CRE je protein bakteriofaga, ki katalizira rekombinacijo med dvema mestoma loxP, vsebujočo 34 baznih parov dolgo zaporedje. Ker miški genom ne vsebuje genov za rekombinazo CRE in zaporedje loxP, jih moramo vnesti v genom (Slika 3). Rekombinazo CRE navadno vnesemo z metodami, opisanimi na sliki 1, mesta loxP pa z metodami na sliki 2, kjer sta mesti loxP vstavljeni na izbrani lokaciji v genomu, med katerima želimo povzročiti delecijo (odstranitev zaporedja DNA). Pogojno izničenje ciljnega gena dosežemo tako, da križamo transgeno linijo, ki nosi rekombinazo CRE pod izbranim promotorjem, in linijo, kjer smo ciljno vstavili zaporedji loxP v gen, ki ga želimo odstraniti v določenih celicah. Pogojni izrez ciljnega gena tako narekujemo z izborom promotorja, ki krmili izražanje rekombinaze CRE v določenem tipu celic, tkiva ali razvojnem obdobju. Le tako bo prišlo do izničenja funkcije preučevanega gena.

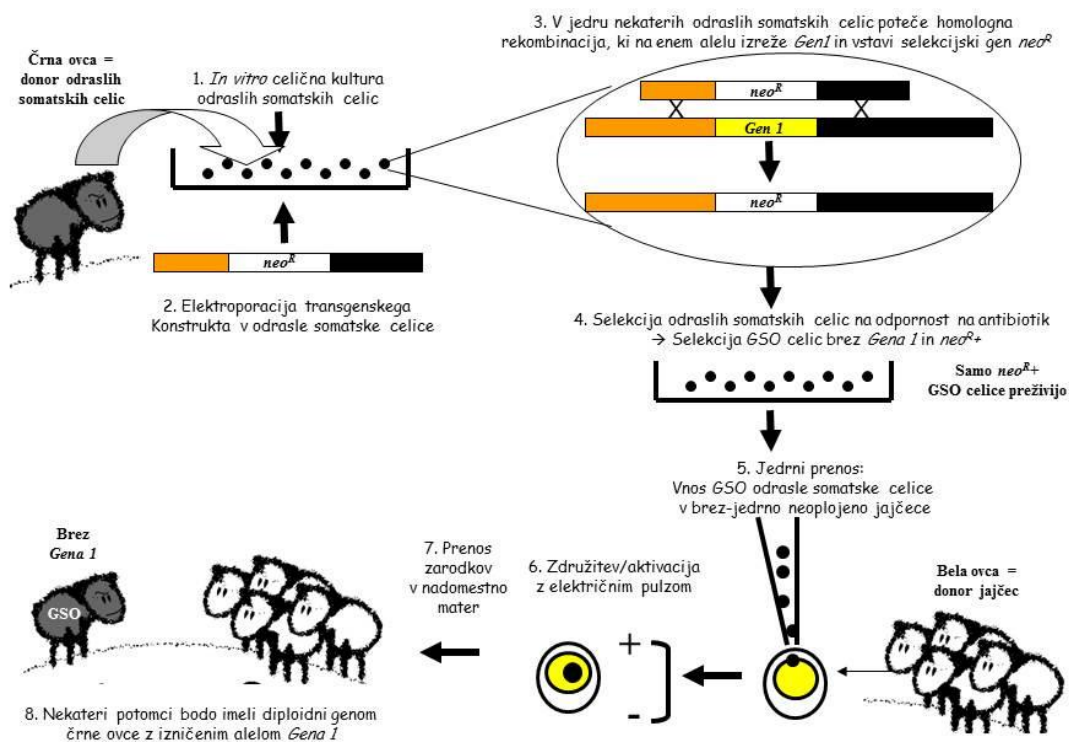


Slika 3: Pogojna transgeneza. Tehnologija pogojne transgeneze CRE-loxP omogoča tudi *in vivo* analizo funkcije esencialnih genov, ki so nujno potrebni za razvoj in preživetje. S kombiniranjem zaporedij loxP (prepoznavna mesta za CRE) in izražanjem rekombinaze CRE v isti živali lahko izrezovanje gena 1 omejimo le na določeno tkivo ali razvojno obdobje.

ODSTRANITEV GENOV ALI GENSKIH ELEMENTOV IZ GENOMA ŽIVALI: METODA Z ODRASLI MI (SOMATSKIMI) CELICAMI

Za uporabo metode transgeneze, opisane v prejšnjem razdelku, moramo imeti na razpolago embrionalne matične celice, ki se lahko pri vnosu v zgodnji zarodek učinkovito vgradijo v vse zarodne plasti razvijajočega se zarodka. Celice s podobnimi lastnostmi, kot so embrionalne matične celice, so sicer uspeli izolirati že pri različnih vrstah živali in človeku. Vendar so samo pri laboratorijskih miših uspeli dokazati uspešno vključitev embrionalnih matičnih celic v razvoj spolnih celic in s tem prenos genske spremembe v naslednjo generacijo. Raziskovalci so prišli na idejo, da bi namesto genskega spreminjanja embrionalnih matičnih celic razvili metodo, kjer bi odrasle diferencirane celice reprogramirali nazaj na razvojno stopnjo, ki bi bila podobna embrionalnim matičnim celicam oziroma zgodnjim zarodkom. Najprej je bilo treba razviti tehnologijo reprogramiranja odraslih diferenciranih celic (kloniranje živali), kar je uspelo skupini prof. dr. Iana Wilmuta na Škotskem z ovco Dolly.

Razvoj kloniranja živali je omogočil razvoj ciljnega genskega spreminjanja tudi pri živalskih vrstah, kjer nimamo na voljo embrionalnih matičnih celic. Izhodni material je odrasla somatska celica v kulturi, ki jo gensko spreminjamo na podoben način, kot spreminjamo embrionalne matične celice. V odrasle somatske celice najprej vnesemo transgeni konstrukt in s postopki selekcije celic v kulturi odberemo celice s ciljno gensko spremembo. Glavna razlika med metodama je v tem, da tu nimamo vmesnega stadija himer kot pri metodi z genskim spreminjanjem embrionalnih matičnih celic in so tako že potomci (kloni) prve generacije heterozigoti z gensko spremembo. Slaba stran metode transgeneze odraslih (somatskih) celic pa je, da je zelo neučinkovita in tehnično zahtevna.



Slika 4: Odstranitev (angl. knockout) genov iz genoma z metodo genskega spreminjanja odraslih somatskih celic in jedrnega prenosa (kloniranja). Odrasle somatske celice so v prikazanem primeru izolirane iz pasme črnih ovc. Podobno, kot je opisano za sliko 2, smo z elektroporacijo vnesli transgeni konstrukt in odbrali tiste odrasle somatske celice, ki so vgradile transgeni konstrukt z genom za odpornost proti neomicinu in hkrati mutirale del ciljnega gena. Te celice potem s tehniko jedrnega prenosa (kloniranja) vnesemo v neoplojeno jajčece, ki smo mu prej odstranili jedro (dednino). Dejavniki, prisotni v citoplazmi neoplojenega jajčeca, reprogramirajo jedro

odrasle somatske celice na začetek razvoja. Električni pulz simulira oploditev in zgodnji zarodek prenesemo v nadomestno mater (v našem primeru belo ovco). Med potomstvom pričakujemo določen delež belih živali, ki pripadajo pasmi nadomestne matere (bele ovce), in nekaj črnih potomcev, ki izvirajo iz gensko spremenjene odrasle celice črne ovce – te imajo na enem alelu izničen gen.

ODSTRANITEV GENOV ALI GENSKIH ELEMENTOV IZ GENOMA ŽIVALI: METODA Z NUKLEAZO CINKOVIH PRSTOV

Tehnologija uporabe nukleaz s cinkovimi prsti je relativno nova metoda (Sevoy s sod. 2012) transgeneze poskusnih živali (angl. Zinc finger nucleases). Te nukleaze so DNA-vezavni proteini, ki omogočajo tarčno editiranje genoma, tako da generirajo lome dvojne vijačnice DNA na mestu genoma, ki ga določi raziskovalec. Povzročeni lomi stimulirajo naravni odziv celice – DNA-popravljalnih mehanizmov, s čimer lahko razvijemo točno določene genomske spremembe (delecije, insercije, zamenjave nukleotidov ipd.). Tehnologija ima tudi to prednost, da ni vezana na uporabo embrionalnih matičnih celic in jo lahko uporabimo pri vrstah poskusnih živali, kjer tovrstnih celic ni na razpolago (Mashimo s sod. 2010).

UČINEK LINIJE, KLONA IN GENETSKEGA OZADJA

Pri izbiri genetskega materiala in načrtovanju poskusov s transgenimi živalmi morajo biti vodje poskusov in izvajalci pozorni na možne (negativne) učinke genetskega ozadja, v katerem so raziskovalci razvili mutacijo, na »klonalni« učinek transgenih matičnih celic ali transgenih somatskih celic, učinek vključkov iz vektorske DNA ter učinke linije transgenih živali oziroma vpliva mesta integracije transgenega konstrukta.

Pri uporabi transgenih poskusnih živali, ki so bile razvite z metodami dodajanja genov (npr. mikroinjiciranja), smo že omenili možne učinke naključne integracije dodanega gena oziroma genomskega elementa. Dodani gen se namreč lahko vgradi v del genoma, ki se sicer ne izraža, zato se tudi dodani gen ne izraža, ali pa se vgradi v del genoma, ki povzroči prekomerno izražanje ali izražanje v napačnem tkivu ali organu. Zato je pred uporabo teh vrst transgenih modelov priporočljivo preveriti tkivno specifičnost in kvantiteto izražene transgena, da bi tako uporabili linije transgene živali s predvidenim vzorcem izražanja dodanega gena. Rezultati s transgenimi linijami so validirani, če so podprti s koherentnimi rezultati, pridobljenimi na vsaj dveh transgenih linijah, ki so nastale iz dveh neodvisnih poskusov mikroinjiciranja oziroma infekcij z viralnimi transgenimi konstrukti.

Pri uporabi transgenih poskusnih živali, ki so bile razvite z metodo ciljnega spreminjanja genoma embrionalnih matičnih celic ali somatskih celic, je poskuse prav tako priporočljivo načrtovati z dvema linijama, ki izhajata iz dveh neodvisnih poskusov elektroporacije transgenega konstrukta v celice. Lahko se namreč zgodi, da je genska ali epigenetska sprememba pri nekem klonu embrionalnih matičnih celic ali somatskih celic specifična samo za ta klon. To lahko vodi do spremembe v fenotipu transgene poskusne živali, ki nima funkcijske povezave z npr. genom, ki je bil ciljno odstranjen. Zato smo lahko prepričani, da je genska sprememba posledica mutacije, takrat ko dobimo enak fenotip pri vsaj dveh transgenih linijah, ki izhajata iz dveh neodvisnih poskusov elektroporacije transgenega konstrukta.

Učinek vključka vektorske DNA se nanaša na fenotipske učinke zaradi njihovega vpliva na izražanje sosednjih ali drugih genov in s tem na fenotip živali. V kar nekaj primerih je bilo v literaturi že dokazano, da lahko npr. prisotnost takih tujih vključkov (npr. gena za rezistenco na antibiotik) vpliva na izražanje sosednjih ali drugih genov in fenotip živali. V nekaterih primerih poročajo celo o letalnem učinku (embrionalna smrtnost). Če je možno izbirati med različnimi linijami z odstranjenim genomskim segmentom, je zaželeno izvajati poskuse na takih modelih transgenih živali, ki po postopku homologne rekombinacije v genomu ne pustijo genskih elementov vektorja ali pa so jim raziskovalci z drugimi metodami (metoda z rekombinazo CRE) odstranili vso vektorsko DNA.

Raziskovalci navadno uporabljajo transgene poskusne živali za evalvacijo tretmajev ali raziskovanja funkcije genov. Za tovrstne raziskave so ključnega pomena pravilno odbrane kontrole (divji tip). Edina prava kontrola za transgeno poskusno žival je tako imenovana kongena linija. To je linija, ki ima enako genetsko ozadje kot transgena linija, razen v tarčnem genomskem odseku, kjer je bila z metodami transgeneze narejena genska sprememba. Če je torej genska sprememba narejena v ozadju linije 129/Sv, lahko za kontrolno linijo (divji tip) uporabimo samo linijo miši 129/Sv in ne drugih linij, ki sicer tudi nosijo divji tip alela. Znano je namreč (Banbury Conference on Genetic Background in mice, 1997), da lahko imajo določene mutacije zelo različne fenotipske učinke, če se nahajajo v različnih genetskih ozadjih (npr. ista mutacija v različnih linijah). Samo primerjave med kongenimi pari omogočajo verodostojne fiziološke primerjave in korektne funkcijske in genetske analize tega segmenta.

UPORABA TRANSGENIH POSKUSNIH ŽIVALI

Temeljne biološke raziskave. Transgene živali so za zdaj edini sistem, ki nam na ravni celega organizma (tako imenovani sistem *in vivo*) omogočajo preučevanje vloge nekega gena ali genomskega elementa. Genomski projekti, kot je projekt človeškega genoma, so odkrili številne nove gene na ravni nukleotidnega zaporedja, pogosto pa ne poznamo njihove vloge *in vivo*. S transgenimi modeli lahko preučujemo fenotipske učinke čezmernega izražanja in odsotnosti izražanja ali učinke zamenjave alelov. Z razvojem metode pogojne transgeneze lahko preučujemo tudi vloge genov *in vivo*, ki so sicer nujni za razvoj in preživetje organizma. Obstajajo številni primeri uporabe transgenih modelov v temeljnih bioloških raziskavah. Kot primer lahko omenimo raziskave enega od začetnikov in inovatorjev tehnologije transgeneze pri živalih, Maria R. Capecchija, ki je z uporabo modelov miši z izničeni gen genске družine HOX ugotovil njihovo pomembno vlogo pri uravnavanju razvoja zarodka. Za to delo je M. R. Capecchi, skupaj z M. J. Evansom in O. Smithiesom, leta 2007 prejel Nobelovo nagrado za medicino. Naslednji nazorni primer so študije rakotvornosti. Obstaja več kot 60 genov, ki pospešujejo rakotvornost (tako imenovani onkogeni), in 20 genov, ki zavirajo rast tumorja – tovrstni geni lahko ob nepravilnem delovanju prispevajo k razvoju raka. Z modeli transgenih miši, ki čezmerno izražajo te gene ali jih ne izražajo, so raziskovalci uspeli določiti vlogo večine teh genov. Raziskovalci so se organizirali v konzorcije in si zadali nalogo, da sistematično razvijejo »knockout« modele za vsak mišji gen (Comprehensive Knockout Mouse Project 2004; Austin s sod. 2004). Sestavili so tudi konzorcij, katerega cilj je razviti pogojne »knockout« modele v mišjih embrionalnih matičnih celicah za večino genov mišjega genoma (<http://www.eucomm.org/>).

Biomedicinske raziskave. Pogosta raba transgenih živali na tem področju je pospešila razvoj preučevanja bolezni (predvsem dednih) pri človeku. Da bi razumeli mehanizme nastanka neke bolezni, morajo raziskovalci imeti dostop do prizadetih celic in tkiv v vseh razvojnih stopnjah neke bolezni. Raziskave tkivnih oziroma celičnih kultur, kjer celice gojimo v inkubatorjih (tako imenovane analize *in vitro*), so sicer prispevale veliko novega znanja o razvoju različnih bolezni, vendar je še veliko tkiv in celičnih tipov, ki jih ne moremo gojiti v laboratorijskih razmerah. Tudi če lahko nekatere celice gojimo v tkivnih kulturah (na primer nevrone), pa te v tem sistemu ne morejo razviti kompleksnosti celičnih tipov in struktur, ki so na primer značilne za nekatera območja možganov. Živalski modeli, bodisi transgeni ali netransgeni, nam omogočajo dostop do teh tkiv in organov ter tako dajejo možnost preučevanja procesov in vpliva okvarjenih genov na ravni tkiv, organov in organskih sistemov. Kot primer lahko navedemo uporabo takih živalskih modelov za raziskovanje odziva imunskega sistema, analize določenih bolezni (na primer sladkorne bolezni) ali na primer vpliva prehrane na razvoj zarodka in podobno.

Za večino človeških bolezni imamo na razpolago razmeroma malo živalskih modelov, ki so posledica spontanij mutacij, saj te naravna selekcija navadno učinkovito izloča iz populacij. Ko znanstveniki potrebujejo neki živalski model za človeško bolezen, morajo tak model največkrat razviti s tehnologijo transgeneze. Razen dednih bolezni, ki so navadno posledica točkovnih ali večjih kromosomskih mutacij, lahko s tehnologijo transgeneze razvijemo na primer model miši, ki postane občutljiv za človeški virus HIV in podobno. Veliko transgenih živalskih modelov ima podobno klinično sliko, kot jo ima človeška bolezen. Taki modeli so primeren vir za raziskave poteka bolezni in za preučevanja

preprečevanja in zdravljenja bolezni. Čeprav je med sesalci veliko biokemijskih – metabolnih poti evolucijsko ohranjenih in zato zelo podobnih, pa med njimi obstajajo tudi velike razlike. Pri miših, na primer, je »knockout« za gen CFTR, katerega okvara povzroča cistično fibrozo, neinformativen, ker imajo miši dodatni gen, ki ga človek nima, zato ne razvijejo simptomov bolezni, ki so značilni za izničenje vloge gena CFTR pri človeku (Guilbault in sod., 2007). V takih primerih se raziskovalci zatečejo k drugi živalski vrsti, kjer pričakujejo podoben odziv na gensko spremembo kot pri človeku – za omenjeni primer cistične fibroze želijo razviti »knockout« za gen CFTR pri ovcah (Clark in sod., 2006).

Živalski transgeni modeli nam omogočajo tudi preučevanje vpliva genetskega ozadja določene mutacije na razvoj in stopnjo kliničnih znakov. Znano je namreč, da ima neka mutacija pri ljudeh lahko zelo različen učinek na fenotip, odvisno od tega, kakšni so aleli »sodelujočih« lokusov drugje v genomu (angl. »modifier« aleli). Ko s transgenezo naredimo želeno mutacijo v živalskem modelu, jo lahko s preprostim programom povratnega križanja vnesemo v genetsko različne linije živali in tako preučujemo tudi vpliv genetskega ozadja.

Naslednja pogosta uporaba v biomedicini je razvoj modelov človeških bolezni, ki omogočajo testiranje novih terapevtskih pristopov. Razvoj novih zdravil terja dolgotrajno testiranje, preden se zdravila pojavijo na policah v lekarni. S temi testi je treba ugotoviti, ali je neko zdravilo učinkovito in varno za uporabo. Terapevtsko učinkovitost nekega zdravila za določeno človeško bolezen lahko najbolje preučimo na živalskem modelu, ki je po klinični sliki najbližji določeni človeški bolezni. To je pogosto lahko prav transgeni model, navadno laboratorijska miš ali podgana. Če zdravilo testiramo na »normalni« laboratorijski živali, ne dobimo vedno odgovora o terapevtski učinkovitosti zdravila, medtem ko je lahko testiranje transgenega živalskega modela s klinično sliko neke človeške bolezni precej bolj informativno. Ko neko zdravilo uspešno prestane poskuse, ki potekajo zunaj živega organizma (analize *in vitro*), in omenjene analize *in vivo* na standardnih in transgenih modelih, lahko gre naprej v preverjanje pri ljudeh, navadno na manjšem vzorcu prostovoljcev.

Druge vrste uporabe transgenih živali (Horvat 2008a, Horvat 2008b), ki jih v teh gradivih ne bomo podrobneje obravnavali, poznajo na področju toksikoloških študij, proizvodnje terapevtskih proteinov, presaditve organov in tkiv iz živali na človeka in za namene povečanja proizvodnosti domačih živali v kmetijstvu.

ZAKLJUČEK

Tehnologije transgeneze živali so se razvile kmalu po tem, ko so raziskovalci leta 1983 prvič uspeli narediti gensko spremembo pri tobaku. Prvi poskus transgeneze pri živalih je bil narejen pri miših leta 1989, kmalu pa so to tehnologijo uporabili pri drugih živalskih vrstah – govedu, prašičih, perutnini, ovcah, žabah, ribah in vinski mušici.

Metode transgeneze omogočajo, da pridobimo živali z želeno spremembo genoma, ki se deduje. Obstajajo trije načini pridobivanja transgenih živali – mikroinjiciranje DNA ali viralni prenos v zgodnji zarodek, gensko manipuliranje embrionalnih matičnih celic in gensko manipuliranje somatskih (odraslih) celic v kombinaciji z jedrnim prenosom. Pri vseh omenjenih metodah je treba v laboratoriju najprej pripraviti tako imenovane transgene konstrukte, ki se po sestavi elementov med seboj razlikujejo predvsem glede na izbrano metodo in namen raziskave. Transgeni konstrukt nato z različnimi metodami uvedejo v sprejemno celico, ki ji želimo spremeniti genom. Sledijo postopki za identifikacijo gensko spremenjenih celic, reproduktivne manipulacije (na primer zgodnjih zarodkov, prenos zarodkov v nadomestne matere in podobno) ter ustrezna parjenja, kar nas na koncu privede do transgene živali.

Pri načrtovanju poskusov s transgenimi živalmi je pomembno preučiti literaturo oziroma postopke, ki so privedli do razvoja transgenih živali. Vodje poskusov in izvajalci morajo biti pozorni na možne (negativne) učinke genetskega ozadja, v katerem so raziskovalci razvili mutacijo, na »klonalni« učinek transgenih matičnih celic ali transgenih somatskih celic, učinek vključkov iz vektorske DNA ter učinke

linije transgenih živali oziroma vpliva mesta integracije transgenega konstrukta. Funkcijske poskuse je nujno izvajati na vsaj dveh neodvisnih transgenih linijah, ki nosita gensko spremembo v tarčnem genu ali genomskem elementu.

LITERATURA

1. Austin CP, Battey JF, Bradley A, et al. The knockout mouse project. *Nat Genet* 2004; 36 (9): 921–4.
2. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on Genetic Background in Mice. *Neuron* 1997; 19: 755–9.
3. Clark AJ, Burl S, Denning C. Genetic modification of sheep by nuclear transfer with gene-targeted somatic cells. *Meth Mol Biol* 2006; 348: 199–212.
4. Devoy A, Bunton - Stasyshyn RK, A., Tybulewicz VL, Smith AJ, Fisher EM. Genomically humanized mice: technologies and promises. *Nat Rev Genet* 2011; 13 (1): 12–20.
5. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36 (1): 1–7.
6. Horvat S, Medrano JF, Behboodi E, Anderson GB, Murray JD. Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res* 1993; 2: 134–40.
7. Horvat S. Transgeneza živali : razlaga osnovnih metod. *Proteus* 2008; 70(6): 259–68.
8. Horvat S. Transgeneza živali: primeri uporabe, etična vprašanja in zakonodaja. *Proteus* 2008; 70(9/10): 401–12.
9. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* 2010; 5(1): e8870.
10. Motaln H, Mcwhir J, Horvat S. *In situ* analysis of Raidd-beta-galactosidase fusion gene expression in transgenic mouse midgestation embryos. *Transgenic Res* 2005; 14: 27–40.
11. Pinkert CA. *Transgenic animal technology*. 2nd ed. London: Academic Press, 2002: 618.
12. Schnutgen F, De-Zolt S, van Sloun P, et al. Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2005; 102 (20): 7221–6.

16 TRANSGENE POSKUSNE ŽIVALI: ETIČNI IN ZAKONODAJNI VIDIKI

Simon Horvat

UVOD

Biotehnologija, kamor sodi tudi transgeneza živali, ponuja možnosti za izboljšave tehnologije reje, povečanje proizvodnosti ter izboljšanje zdravja živali in ljudi, kar je lahko ključnega pomena za zadovoljevanje potreb rastočega prebivalstva. V tem dodatku gradiv za vodje poskusov se bomo dotaknili nekaterih bioetičnih vprašanj, ki jih sproža transgeneza živali, ter opisali zakonodajo, ki ureja to področje pri nas in v Evropski uniji. Pri načrtovanju poskusov s transgenimi živalmi morajo vodje poskusov presojski različne etične vidike ter morebitne negativne vplive uporabe transgene poskusne živali na žival, človeka in okolje. Prispevek je prirejen po članku (Horvat, 2008).

ETIČNA VPRAŠANJA

Podobno kot vsaka nova tehnologija v bioznanostih tudi transgeneza živali sproža etične pomisleke. Na eni strani imamo stališče, da spreminjanje genoma živali s tehnologijo transgeneze sploh ni sprejemljivo, ker preveč posega v samo bistvo živali in krši njihove pravice (deontološki pristop). To stališče je nekoliko togo in enostransko, saj lahko ugotovimo, da »narava« sama, z razmeroma visoko pogostostjo spontan in naključnih mutacij pri vseh živalskih vrstah, redno »eksperimentira« ter spreminja genome, pogosto tudi z zelo škodljivimi posledicami za zdravje, počutje živali, okolje – hkrati pa s tem proizvede tudi nove, zaželene genske različice, na katere lahko deluje naravni izbor. Na drugi strani so zagovorniki strogega utilitarističnega pristopa, ki so uporabi transgeneze pri živalih zelo naklonjeni, ker naj bi možne koristi te tehnologije večinoma prevladale nad tveganji in negativnimi posledicami. To stališče je pogosto naravnano preveč antropocentrično in transgenezo živali obravnava pretežno z vidika koristi za človeka, z manjšo težo presojanja možnih negativnih posledic za živali in okolje. Poleg tega je pri utilitarističnem pristopu pogosto težko realno oceniti in količinsko ovrednotiti koristi in tveganja ter odločitve utemeljevati na teh ocenah.

Obe omenjeni skrajni stališči sta lahko preveč togi in ne prispevata vedno k plodnejši razpravi o primernosti ali neprimernosti uporabe te tehnologije. Nekatere sodobnejše aplikativne filozofske šole v živalsko bioetiko vpeljujejo bolj »pluralistični« etični pristop (Gambor in Sandoe, 2003; Lassen s sod., 2006), ki upošteva več različnih etičnih načel. Ta model vključuje presojanje upravičenosti uporabe te tehnologije na podlagi načel koristnosti, neškodovanja živalim, ljudem in okolju, načelu avtonomije, načelu pravičnosti (stremeti je treba k pravični porazdelitvi »slabega in dobrega« med ljudi in živali – »fair play«), načelu nadzora in podobno.

Če se vsak primer transgeneze živali presoja po teh načelih, lahko do najmanjše možne mere zmanjšamo vse negativne učinke na zdravje oziroma počutje živali, na ljudi in okolje ter hkrati do največje mogoče mere povečamo koristi za posameznika oziroma širše skupnosti. Že do sedaj je tehnologija transgeneze večinoma koristila vsem tem področjem, vedno pa bodo pri uporabi te tehnologije obstajala vprašanja glede zdravja in počutja živali, varnosti za ljudi in okolje, ki jih je treba presojski od primera do primera. Zato je dolžnost vsakega vodje poskusa, da pri načrtovanju poskusov podrobno preuči koristi raziskovanja s transgenimi živalmi in tveganja, ki so povezana z uporabo teh modelov oziroma tehnologije.

Javnost je glede uporabe tehnologije transgeneze pogosto zaskrbljena predvsem zaradi potencialnih negativnih posledic za zdravje in počutje živali. Čeprav ima tehnologija transgeneze živali lahko negativne učinke, je treba upoštevati, da lahko tudi netransgene oblike genskih sprememb (umetna selekcija, uporaba kemikalij, sevanje) negativno vplivajo na zdravje in počutje živali. Nekateri so celo

mnenja, da lahko ciljne genske spremembe v točno določenem genu s pričakovanimi učinki ter povečanim nadzorom nad izvajanjem takih poskusov povzročijo manj negativnih posledic za zdravje in počutje živali kot prej omenjene »klasične« oblike genskih sprememb, ki navadno proizvajajo naključne genske spremembe. Sklenemo lahko, da je področje zdravja in počutja živali pri presojanju uvažanja transgeneze pri živalih brez dvoma pomembno. Hkrati pa je treba dodati, da se v kvalitativnem smislu vpliv transgeneze živali na zdravje in počutje živali ne razlikuje od klasičnih tehnologij, kjer se tovrstne posledice pogosto ne presojajo tako podrobno. Vsekakor pa morajo vodje poskusov pri načrtovanju poskusov s transgenimi živalmi upoštevati zgoraj naštete dileme in podrobno preučiti predvsem možne negativne učinke, ki jih lahko ima tretma ali že sama genska sprememba na zdravje in počutje poskusne živali.

ZAKONODAJA NA PODROČJU TRANSGENEZE ŽIVALI

V primeru načrtovanja poskusov s transgenimi poskusnimi živalmi morajo vodje poskusov pridobiti dovoljenja za poskuse na živalih (vloga na VURS), dovoljenje za odobritev zaprtega sistema, kjer bodo nastanjene transgene živali, ter za delo s transgenimi poskusnimi živalmi, ki so uvrščene v ustrezen varnostni razred (vloga na Ministrstvo za okolje).

Predpisi na področju razvoja in uporabe transgenih živali so urejeni na ravni Evropske unije in nacionalnih ravneh njenih članic. Ko je v Evropski uniji sprejeta nova direktiva na tem področju, mora vsaka članica prevzeti določbe te direktive v svojih predpisih. Na ravni Evropske unije je na primer tak predpis Direktiva 2001/18 »Deliberate release into the environment of genetically modified organisms« – v prevodu »Namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje«.

V Sloveniji imamo na podlagi krovnih predpisov Evropske unije vpeljane nacionalne predpise na področju raziskav z gensko spremenjenimi živalmi, in sicer Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Ur. l. št. 23/05) s pripadajočimi podzakonskimi akti. Za izvajanje omenjenega zakona so pristojni Ministrstvo za okolje in prostor, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Ministrstvo za zdravje. Dodatne informacije in povezave na zakone, uredbe in pravilnike glede ravnanja z gensko spremenjenimi organizmi (GSO) so zbrane na Slovenskem portalu biološke varnosti, na naslovu <http://www.biotechnology-gmo.gov.si>.

Vlada je za strokovno pomoč ministrstvom, pristojnim za odločanje o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi, ustanovila znanstveni odbor za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtih sistemih in znanstveni odbor za sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje in sproščanje izdelkov na trg, ki delujeta ob podpori strokovnih služb Ministrstva za okolje in prostor. V odboru za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtih sistemih sodelujejo strokovnjaki, ki presojajo prijave zaprtih sistemov posameznih organizacij za delo z gensko spremenjenimi živalmi (samih prostorov) ter prijave načrtovanega dela z gensko spremenjenimi organizmi. Pri tem preučijo zadrževalne ukrepe, prostore in opremo (pogosto z dodatnimi ogledi), način dela, varnostne vidike in ravnanje z odpadki. Posebej skrbno pretehtajo oceno tveganja gensko spremenjenih organizmov za okolje, ki jo izdela prijavitelj (navadno vodja poskusa), in preverijo ustreznost uvrstitve gensko spremenjenih organizmov v varnostni razred, lastnosti sprejemnih organizmov, genskih vključkov ter vektorjev. Odbor za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje in sproščanje izdelkov na trg pa presoja namerno sproščanje in trženje gensko spremenjenih živali. Pri razvoju transgenih živali sta znanstvena odbora posebej pozorna pri ocenjevanju mogočih tveganj zaradi genske spremembe za zdravje živali ter ljudi (možnost pojava novih alergij, morebitne toksičnosti transgenskega produkta in podobno). Ocenijo tudi možne spremembe v obnašanju gensko spremenjenih živali (na primer povečana agresivnost, neznčilna obnašanja za vrsto) oziroma ali bi genska sprememba lahko povzročila, da bi transgene živali lahko postale »rezervoar« za človeške bolezni. Ocenjujejo se tudi možni negativni vplivi na ekosistem oziroma naravne populacije pri nenamernem sproščanju takih živali v okolje. Na splošno velja, da so pri transgenih živalih naštet tveganja zelo nizka, vendar je kljub vsemu treba skrbno obravnavati vsak primer posebej. Medtem ko na primer pri nenamernem izpustu transgenega goveda ne pričakujemo trajnih in pomembnejših negativnih vplivov na naravne populacije živali, rastlin in okolja, je pri gojenju transgenih rib, kjer so ti

vplivi lahko večji, na mestu večja previdnost. Zato je na primer ena od zahtev pri pridobivanju dovoljenja za rejo transgenih lososov (trenutno v teku v Združenih državah Amerike in Kanadi) za uporabo v širši komercialni reji prav sterilnost teh transgenih živali, da bi tako v primerih nenamernih sproščanj v okolje preprečili morebitna križanja z naravnimi populacijami.

V okviru Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano je v nadzor glede dela z gensko spremenjenimi živalmi vključena tudi Veterinarska uprava Republike Slovenije (VURS), ki na podlagi Zakona o zaščiti živali (Ur. l. št. 20/04) ter Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS št.88/06) izdaja dovoljenja za poskuse na živalih. V okviru vlog za ta dovoljenja se presoja predvsem ustreznost protokolov oziroma posegov, ki se izvajajo na živalih. Pri tem se Veterinarska uprava Republike Slovenije opira tudi na mnenje etične komisije za poskuse na živalih, ki deluje kot strokovni in posvetovalni organ na področju zaščite živali pri poskusih pod okriljem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Pri pisanju vloge morajo vodje poskusov posvetiti pozornost tudi etičnim vidikom uporabe transgenih poskusnih živali.

Ker so lahko postopki pridobivanja dovoljenj za poskuse s transgenimi poskusnimi živalmi (vloga na VURS in MOP) dolgotrajni (več mesecev), je priporočljivo, da vodje poskusov pripravijo prijave vlog vsaj pol leta pred načrtovanjem izvedbe poskusa.

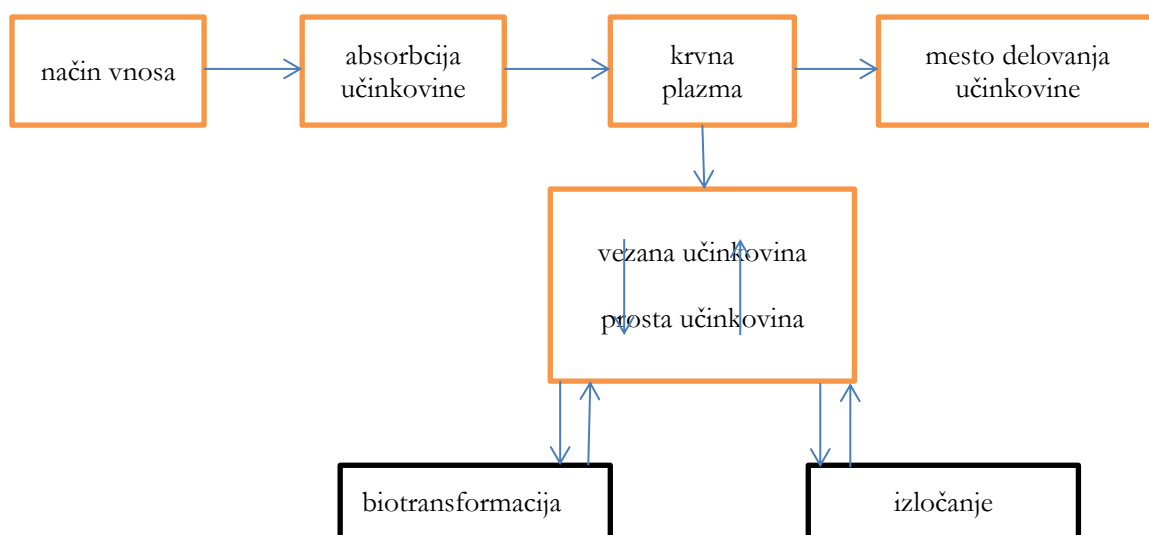
LITERATURA

1. Horvat S. Transgeneza živali: primeri uporabe, etična vprašanja in zakonodaja. *Proteus* 2008; 70 (9/10): 401–12.
2. Slovenski portal biološke varnosti: <http://www.biotechnology-gmo.gov.si>.

Pri poskusih, ki jih opravljamo na živalih, se velikokrat poslužujemo aplikacij različnih učinkovin. Za razumevanje odziva organizma na aplicirane snovi moramo poznati tudi vpliv organizma na aplicirano snov. S kinetičnimi študijami se pojasnjuje, kakšna je usoda aplicirane snovi. Na kinetiko neke učinkovine vplivajo dogajanja v organizmu, ki so vezana na:

- absorpcijo učinkovine z mesta vnosa,
- razporeditev učinkovine v organizmu,
- biotransformacijo,
- izločanje učinkovine iz organizma.

Kinetiko učinkovin v organizmu prikazuje Slika 1.



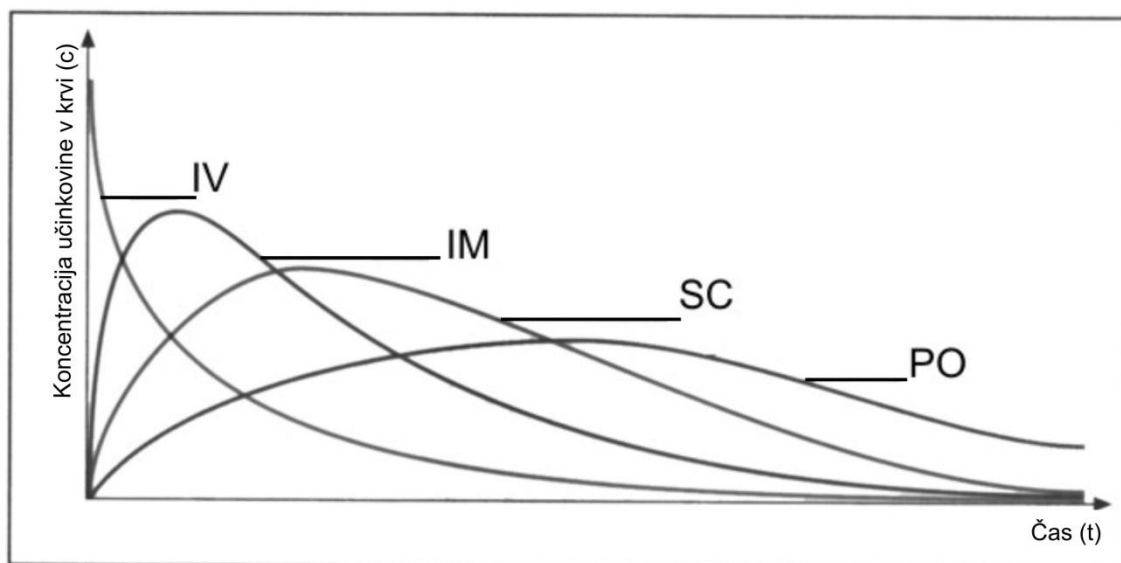
Slika 1. Prikaz kinetike učinkovin.

Glede na cilje raziskave in fizikalno-kemijske ter farmakološko-toksikološke lastnosti pripravka se izbere način vnosa določene učinkovine.

Za določen način vnosa (nanosa) pripravka se odločimo glede na to, ali želimo z njim doseči **lokalni (topikalni)** ali **sistemiški** učinek. Kljub temu pa lahko dosežemo sistemske učinke tudi pri pripravkih, ki ji vnesemo topikalno, če se z mesta vnosa absorbirajo v zadostni količini. Ob sistemskem vnosu pa se lahko pojavijo lokalni učinki (npr. dražeče delovanje na tkivo, protibolečinski učinek) na mestu vnosa oz. nanosa.

Pripravke lahko vnašamo na kožo in vidne sluznice prek naravnih telesnih odprtih (PO - peroralno – skozi usta) ali pa mimo prebavil – parenteralno: v podkožje – subkutano (SC), v mišico – intramuskularno (IM), v veno – intravenozno (IV), v trebušno votlino – intraperitonealno (IP).

Absorpcija je proces prehajanja učinkovine iz tkiva, kjer je bil pripravek apliciran, v kri. Pri aplikaciji učinkovine v veno se takoj ves odmerek nahaja v krvi, pri drugih načinih aplikacije pa je absorpcija odvisna od fizikalnih in kemičnih lastnosti pripravka ter od prekrvavljenosti tkiva. Tako je na primer absorpcija istega pripravka pri vnosu v mišico hitrejša kot pri vnosu v podkožje. Dinamiko koncentracij učinkovin v krvi po različnih načinih vnosa prikazuje slika 2.

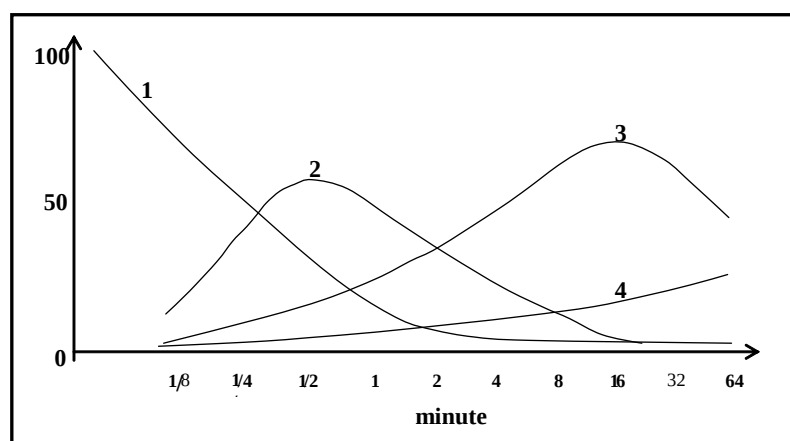


Slika 2. Koncentracija preskušane učinkovine (zdravila) v krvi v odvisnosti od časa. Z izbiro načina vnosa lahko vplivamo na koncentracijo preskušane snovi v krvi (IV – intravenozno; IM – intramuskularno; SC – subkutano; PO – peroralno); povzeto po Luellaman et al. 2000.

Po absorpciji pripravka ali po IV vnosu pripravka se odmerek najprej razporedi v krvi, ki ga transportira v druga tkiva in organe. V krvi je učinkovina lahko v prosti obliki ali pa je vezana na beljakovine krvne plazme, biološko aktivna pa je le prosta oblika učinkovine. Vezani del pripravka predstavlja "depo", iz katerega se sprošča učinkovina, ko se njena koncentracija v krvi zniža zaradi prehoda v okoliško tkivo, biotransformacije ali izločanja.

Učinkovine se po krvi razporedijo najprej v dobro prekrvavljena tkiva (centralni kompartment, tj. oddelek – možgani, srce, jetra, pljuča in ledvice), nato pa tudi v slabše ali srednje prekrvavljena tkiva (periferni površinski kompartment – koža, skeletna mišičnina) ter na koncu še v tkiva, ki so najmanj prekrvavljena (periferni globinski kompartment – maščobno tkivo, sklepi, veziva in kosti).

Čas trajanja učinka pripravka je odvisen od njegove redistribucije ali prerazporeditve v organizmu (slika 3).



Slika 3. Primer razporeditve tiopentala po IV vnosu: 1 – v plazmi, 2 – v dobro prekrvavljenih tkivih (možgani, srce, jetra, ledvica), 3 – v mišicah in koži, 4 – v maščobnem in kostnem tkivu; povzeto po Čupić et al. 2007.

Učinkovine se iz organizma izločajo v obliki njihovih presnovkov ali pa v nespremenjeni obliki. Izločanje pripravkov lahko poteka prek ledvic, jeter, pljuč, črevesja, znoja, slin, solz, mleka, večinoma na več načinov istočasno.

LITERATURA

1. Adams HR, ed . Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003.
2. Čupić V, Muminović M, Kobal S, Velež R. Farmakologija. Beograd: Samozaložba, 2007.
3. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol 2001; 21 (1): 15–23.
4. Luellmann H, Ziegler A, Mohr K, Bieger D, Wirth J. Color atlas of pharmacology. Stuttgart: Thieme, 2000.

18 NAČINI APLIKACIJE RAZLIČNIH PRIPRAVKOV POSKUSNIM ŽIVALIM; POSTOPKI IN PRINCIPI

Silvestra Kobal, Robert Frangež

Pripravki, ki jih uporabljamo za aplikacijo živalim, na mestu vnosa ne smejo povzročati poškodb niti ne smejo povzročati draženja.

Za peroralni vnos so pomembne tudi njihove organoleptične lastnosti, predvsem vonj in okus.

Pripravki, namenjeni za parenteralni vnos, morajo biti **sterilni**. S parenteralno aplikacijo nesterilnih pripravkov v poskusno žival vnesemo mikroorganizme, ki lahko motijo ali celo ogrozijo potek poskusa. Praviloma v pripravke za parenteralno aplikacijo ne dodajamo konzervansov, razen v izjemnih primerih (npr. če ni možna končna sterilizacija po pripravi).

Pribor, ki ga uporabljamo za apliciranje, mora biti steril. Najprimernejši je pribor za enkratno uporabo. Paziti moramo, da pribora ne onesažimo med sestavljanjem in odvzemom pripravka iz embalaže; npr. ob odlaganju na delovni pult pred vnosom v žival.

Pripravki za parenteralni vnos so navadno v obliki injekcijskih raztopin, lahko pa se aplicirajo tudi kot infuzije in implantati oziroma so v obliki koncentratov ter praškov, iz katerih pripravimo injekcije ali infuzije. Poleg **sterilnosti** je pri tekočih oblikah potrebno upoštevati še **pH**, ki mora biti pri tekočinah za SC ali IM vnos približno **7,4**, torej blizu nevtralnega. Kadar vnašamo raztopine z bolj kislim ali bazičnim pH, moramo pot vnosa še posebej previdno izbrati in jo upoštevati. V nasprotnem primeru lahko povzročimo poškodbe tkiva in nepotrebno trpljenje živali. Takšen primer je vnos tiopentala. Raztopina te učinkovine je močno bazična in jo je potrebno vnesti IV. Ob vnosu paravensko (v okoliško tkivo) povzroči nekrozo tkiva, ki jo spremlja bolečina.

Pripravki za parenteralni vnos morajo praviloma biti **izotonični**. Hiper- ali hipotonične raztopine lahko povzročijo poškodbe tkiva oziroma krvnih celic, zato jih vnašamo počasi in v majhnih odmerkih, če se njihovi uporabi ne moremo izogniti.

Injekcijskih raztopin, ki niso pripravljene na osnovi **vodnih tekočin**, praviloma ne vnašamo IV. Pri tem načinu vnosa se izogibamo **emulzijam** in **suspenzijam**, uporabljamo le **raztopine**, pripravljene z uporabo vode za injekcije ali fiziološke raztopine. Raztopine morajo biti bistre in brez vidnih delcev, v emulziji ne smemo opaziti ločenih faz, posamezne faze suspenzije pa se morajo ob stresanju popolna dispergirati.

Pripravke za parenteralni vnos pred vnosom ogrejemo oziroma ohladimo na **temperaturo**, ki je blizu telesni oziroma vsaj na sobno temperaturo. Vnos prehladne ali pretople raztopine je za žival neprijeten, lahko pa povzroči tudi poškodbe tkiva in nepotrebno trpljenje živali.

Na izbiro načina dajanja (aplikacije) pripravka vplivajo kemijske in fizikalne lastnosti pripravka ter način delovanja in pričakovani učinki pripravka. Poskusnim živalim lahko pripravke nanašamo na telesne površine, ki so v stiku z zunanjim svetom (koža, sluznice), vnašamo v organizem skozi naravne telesne odprtine (z vdihovanjem – z inhalacijo, skozi usta ali peroralno – **PO**, skozi nosne odprtine ali pernazalno) ali pa jih vnašamo mimo prebavil oz. parenteralno (v kožo – intradermalno – **ID**, pod kožo – subkutano – **SC**, v trebušno votlino – intraperitonealno – **IP**, v mišico – intramuskularno – **IM**, v veno – intravensko – **IV**). Pri parenteralni aplikaciji se morajo upoštevati pravila asepse in uporabljati sterilni pribor za vnos pripravka (sterilne brizge in injekcijske igle). Injekcijske igle so lahko različnih velikosti (dolžine in debeline) glede na vrsto živali in način aplikacije, praviloma pa čim tanjše. Dajanje različnih pripravkov peroralno z vmešavanjem v hrano ali v pitno vodo je najmanj zahteven način vnosa pripravkov, vendar je pogosto zaradi (ne)natančnosti odmerkov in odvrčajočega okusa in vonja pripravka ne dovolj natančen včasih pa celo ne mogoč. Zato se dajanje pripravkov živalim peroralno največkrat izvaja z orogastrično sondo ustreznih dimenzij.

DAJANJE PRIPRAVKA *PERORALNO* – *PO*

Za peroralno aplikacijo pripravkov živalim predhodno ni potrebno dajati zdravil za pomiritev ali za lokalno oz. splošno anestezijo. Pri miši skozi usta med zobmi vstavimo orogastrično sondo v želodec (sl. 1).



Slika 1: Peroralna aplikacija pripravka pri miši. (Povzeto po McLeod, 1970).

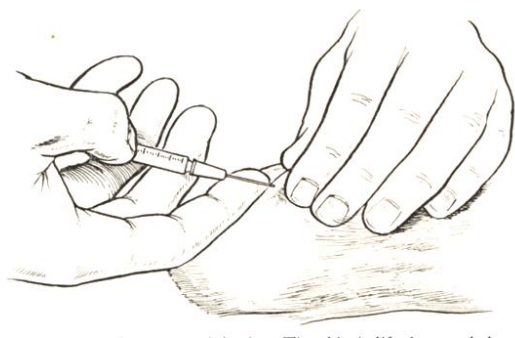
Sonda je cevka iz umetne mase premera prib. 1 mm in dolžine 3 cm. Da se prepreči poškodba cevke zaradi grizenja miši, miški vstavimo med zobe čep iz primerne mase (guma). Naenkrat se lahko miškam aplicira do 0,5 ml pripravka (teža miške 20 – 25 g). Pri podgani je možno dajanje pripravka z brizgo v usta ali s pomočjo tope kovinske sonde, ki se uvede v požiralnik in nato, če je potrebno, uvede še neposredno v želodec. Sonda naj bo dolžine prib. 12 cm in debeline prib. 2 mm (teža podgane 250 g). Naenkrat se lahko vnese do 1 ml pripravka. Pri budri (npr. teže 350 g) uporabimo sondo ali topo kovinsko iglo debeline 2 mm. Maksimalni volumen pripravka, ki se ga lahko vnese na opisan način je 1 ml. Kuncu (teža kunca 2,5 kg) se lahko pripravek v volumnu do 0,5 ml vnese peroralno z brizgo neposredno v usta, če pa so potrebne večje količine ali pa je pripravek neprijetnega okusa se vnos pripravka opravi po predhodni sedaciji živali in vstavitvi želodčne sonde premera 5 mm skozi luknjo med zobe vstavljenega klina (sl. 2). Na ta način se lahko vnese do 7,5 ml pripravka.

Slika 2: Dajanje pripravka preko želodčne sonde pri kuncu. (Povzeto po Siegfried, 1958).



DAJANJE PRIPRAVKA V PODKOŽJE: *SUBKUTANO – SC*

V kožno gubo, kot prikazuje slika 3, na hrbtu miške vbrizgamo na eno mesto in naenkrat v podkožje od 0,5 – 1 ml pripravka. Za dajanje pripravka v podkožje so primerne igle debeline 0,45 mm (26 G). Na podoben način lahko podgani z iglo debeline 0,55 mm (24 G) vbrizgamo na eno mesto in naenkrat od 1 do 5 ml pripravka. Pri budri se pripravki vnašajo z iglo debeline 0,55 mm (24 G) v podkožje kožne gube na področju prsnega koša. Na eno mesto in naenkrat se lahko pri budri v podkožje da od 1 do 2 ml. Pri kuncu se lahko v podkožje kožne gube na hrbtu z iglo debeline 0,8 mm (21 G) na eno mesto in naenkrat vbrizga od 1,5 – 5 ml pripravka.



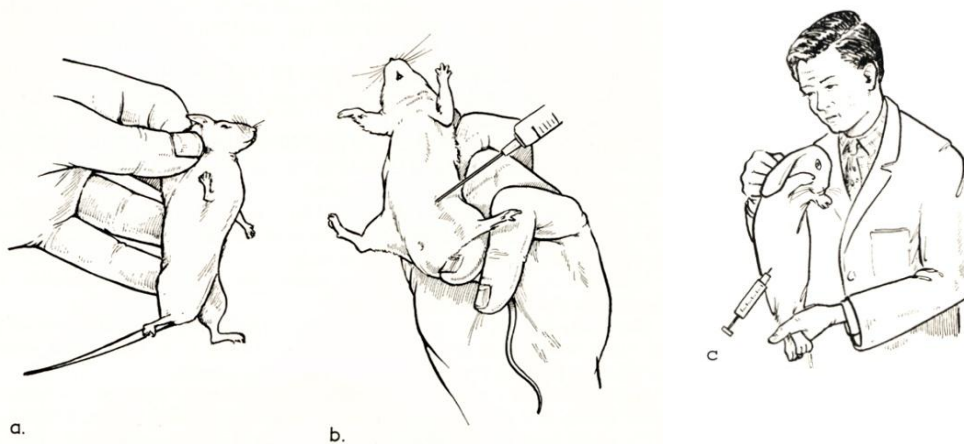
Slika 3: Dajanje pripravka podkožno. Iglo zabodemo pod kotom 45° v kožno gubo. (Povzeto po McLeod, 1970).

DAJANJE PRIPRAVKA V MIŠICO: *INTRAMUSKULARNO – IM*

Pri miši se pripravek daje v stegensko mišico, in sicer na eno mesto in naenkrat do 0,05 ml. Za dajanje pripravka v mišice se uporabljajo igle premera 0,45 mm (26 G). Pri podgani in budri se pripravek daje z iglo premera 0,50 mm (25 G). Naenkrat se lahko vbrizga do 0,1 ml pripravka. Pri kuncu se lahko pripravek ob pomoči asistenta da v stegensko mišico ali mišice pleč. Pri tem se uporabljajo igle premera 0,5 mm (25 G). Na eno mesto in naenkrat se lahko vbrizga največ 0,2 ml pripravka.

DAJANJE PRIPRAVKA V TREBUŠNO VOTLINO: *INTRAPERITONEALNO – IP*

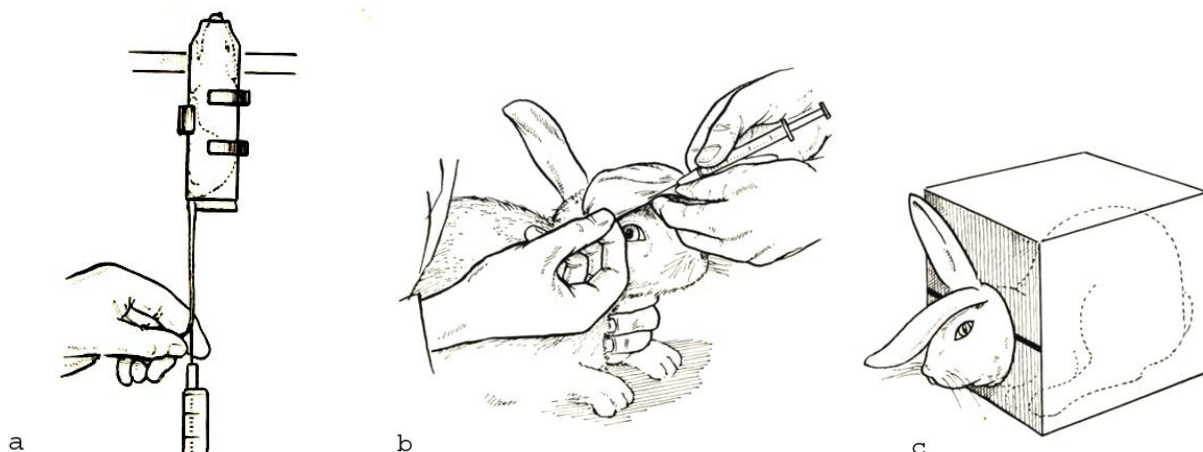
Miško fiksiramo s prijemom za rep in kožno gubo na vratu in jo postavimo v lego, da je proti nam obrnjena s trebuhom. Uporabljajo se igle s premerom 0,5 mm (25 G), vbod v trebušno votlino izvršimo preko trebušne stene približno 2 mm stran od popka (sl. 4 b).



Slika 4: Dajanje pripravka v trebušno votlino pri miški in kuncu a: fiksiranje miške, b: injiciranje pripravka v trebušno votlino, c: fiksacija in injiciranje pripravka v trebušno votlino pri kuncu (Povzeto po McLeod, 1970).

Naenkrat se lahko vbrizga do 1 ml pripravka. Pri podgani in budri se pripravek vnaša v trebušno votlino 3 mm stran od popka. Volumen enkratnega dajanja pripravka je pri podgani do 5 ml, pri budri pa do 10 ml. Za kunce (sl. 4 c) se uporabljajo igle debeline do 0,8 mm (21 G). Naenkrat se lahko v trebušno votlino vnese do 20 ml pripravka. Mesto vboda igle pri kuncu je približno na sredi med prsnico in sramno kostjo, levo oz. desno od sredinske trebušne črte.

DAJANJE PRIPRAVKA V VENO: *INTRAVENOZNO – IV*



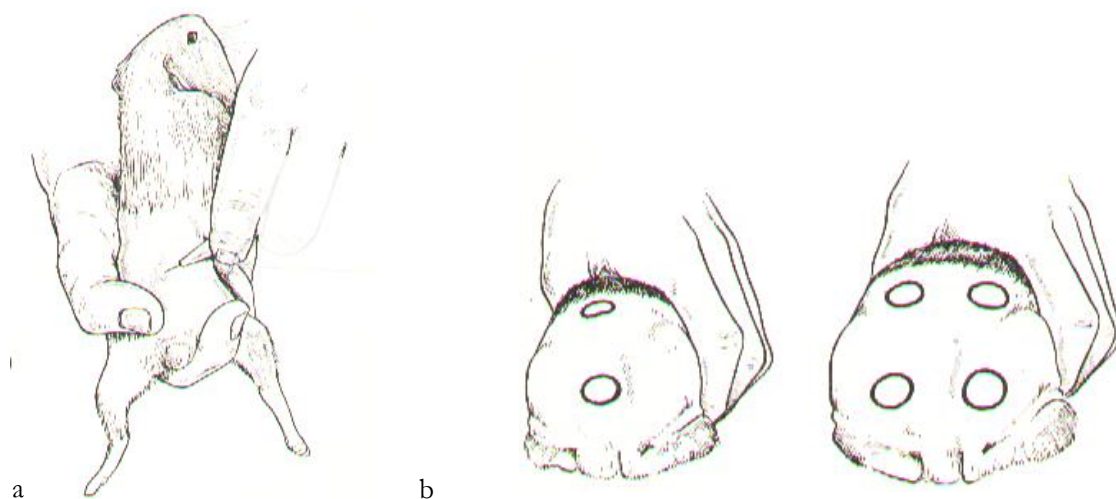
Slika 5: Dajanje pripravka intravensko pri miški (a) in pri kuncu (b). c: fiksacija kunca. (Povzeto po McLeod, 1970).

Primerno fiksirani miški (uporaba posebne kletke, sl. 5 a) se lahko pripravek vnese skozi stransko repno veno. Priporoča se, da se rep za prib. 2 min. potopi v vodo, ki ima temperaturo okrog. 50 °C. S tem se izzove aktivna hiperemija in razširitev ven, kar omogoči lažjo vstavitve injekcijske igle. Naenkrat se lahko vnese do 0,2 ml pripravka. Pri tem se uporabljajo igle do debeline 0,5 mm (25 G). Pri podgani se lahko naenkrat vnese skozi kanilirano stransko repno ali podjezično veno do 0,5 ml pripravka. Pri tem se uporabljajo igle debeline 0,5 – 0,6 mm (25 – 23 G). Za dajanje pripravka v veno so pri budri primerne ušesna vena, vena safena in dorzalna vena penis. Naenkrat lahko skozi kanilo, ki je debeline od 0,40 – 0,45 mm (26 – 27 G) se lahko vnese do 0,5 ml pripravka. Pri kuncu (Sl. 5b) se lahko v ušesno veno z uporabo igle, ki je premera od 0,6 – 0,8 mm (23 – 21 G) vnese naenkrat največ 5 ml pripravka.

Priporoča se, da se pred dajanjem zdravila v ušesno veno izzove aktivna hiperemija na področju vnosa pripravka z gretjem ali z masažo uhlja.

DAJANJE PRIPRAVKA V KOŽO: *INTRADERMALNO – ID*

Pri miški je zaradi tanke kože to relativno zahteven poseg, ki se ga opravi na sedirani živali z uporabo igle premera manj kot 0,3 mm. Pri podgani in budri je dovolj fiksacija živali, ki jo opravi asistent. V kožo na hrbtu se lahko pri podgani, budri (Sl. 6) in kuncu z injekcijsko iglo, ki je tanjša od 0,45 mm (26 G), vnese največ do 0,1 ml pripravka.



Slika 6: Dajanje pripravka v kožo (a) in mesta za kožno in podkožno injiciranje pripravka (b), pri budri. (Povzeto po McLeod, 1970).

DAJANJE PRIPRAVKA Z VDIHAVANJEM (Z INHALACIJO)

Dajanja pripravka z vdihovanjem se pri poskusnih živalih redko poslužujemo. Pripravki, ki se vnašajo z vdihovanjem morajo biti v obliki aerosola, dima ali hlapov. Prostor v katerem se pripravek vnaša z vdihovanjem (steklena posoda s steklenim pokrovom iz brušenega stekla), mora biti dobro zaprt, živali pa morajo biti določen čas izpostavljene delovanju pripravka. Ta način aplikacije se pri poskusnih živalih uporablja le pri aplikaciji lahko hlapnih tekočih splošnih anestetikov z namenom, da se žival uvede v splošno anestezijo ali za humano usmrnitev živali.



Slika 7: Dajanje pripravka z vdihavanjem.

LITERATURA

1. Adams HR, ed. Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003.
2. Beynen AC, Festing MFW, van Monfort MAJ. Design of animal experiments. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds.. Principles of laboratory animal science. Amsterdam: Elsevier Science, 1993: 241–253.
3. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol 2001; 21 (1): 15–23.
4. Luellmann H, Ziegler A, Mohr K, Bieger D, Wirth J. Color atlas of pharmacology. Stuttgart: Thieme, 2000.
5. Jung S. Zucht und Haltung der wichtigsten Laboratoriumsversuchstiere. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1958.
6. McLeod LJ. Pharmacological experiments on intact preparations. Edinburgh: E. & S. Livingstone, 1970.
7. Sok M. Temelji eksperimentalne kirurgije in poskusov na živalih. Ljubljana: Podvinski, 1996: 45–66.
8. Siegfried J. Zucht und Haltung der wichtigsten Laboratoriumsversuchstiere. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1958.

UVOD

Številni dejavniki lahko vplivajo na zdravje in počutje poskusnih živali, na ta način pa tudi na raziskovalne rezultate. To poglavje obravnava najpomembnejše dejavnike, ki lahko pri poskusnih živalih privedejo do nastanka stresa, bolečine in trpljenja, kar se lahko odraža v irelevantnih rezultatih in napačnih sklepanjih. Zato je pomemben del poglavja namenjen razlagi mehanizmov nastanka stresnega odziva. Vpliv številnih dejavnikov na raziskovalne rezultate je možno zmanjšati na minimum z uporabo primernih prostorov in opreme za nastanitev živali, s pravilnim načinom rokovanja z živalmi, s poznavanjem biologije živali in zagotavljanjem njihovih bioloških potreb ter z zmanjševanjem bolečine, stresa, distresa in trpljenja v poskusnih postopkih, še posebej v primeru invazivnih posegov.

OPREDELITVE BOLEČINE, STRESA, DISTRESA IN TRPLJENJA

Bolečina je po opredelitvi Mednarodnega združenja za raziskovanje bolečine (IASP) neprijetna senzorična in čustvena zaznava, povzročena s poškodbo ali nevarnostjo poškodbe. Nocicepcija pomeni zaznavo bolečinskih dražljajev, ki nastanejo po termičnem, mehanskem ali kemičnem vzdraženju bolečinskih receptorjev (nociceptorjev) lokalno na mestu tkivne poškodbe. Bolečina je subjektivna izkušnja, ki prav tako lahko spremlja nocicepcijo in vključuje tudi spremembe v obnašanju živali.

Distres je v Vodilu za prepoznavanje in ocenjevanje bolečine živali (UPAW 1989) opredeljen kot stanje, ko žival porabi adaptacijske mehanizme glede na nove razmere v okolju in se ne more več adaptirati na stresorje. To lahko vodi v bolezen in pogin živali. Nelagodje je blaga oblika distresa. Definicija distresa vključuje tudi strah, frustracije in izčrpanost.

Trpljenje je posebno stanje zavesti, ki ni bolečina, lahko pa je posledica bolečine ali distresa. Bolečina in distres lahko pripeljeta do trpljenja živali, če sta zelo intenzivna ali dalj časa trajata. Trpljenje se pojavi, ko žival ne tolerira več bolečine ali distresa. Kot posledica se pojavijo znaki, kot so zastoj v rasti, sprememba v obnašanju, zmanjšana skrb za čiščenje kože ipd.

KAJ STA STRESOR IN STRES?

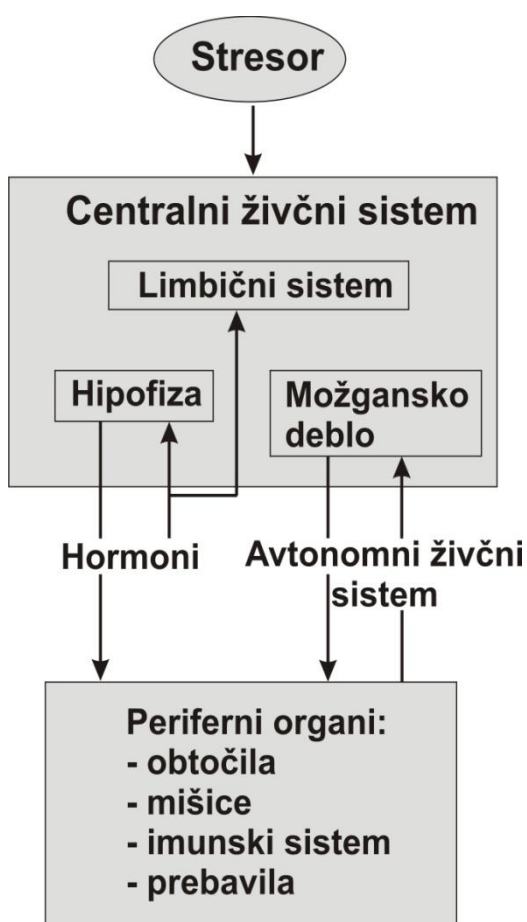
Beseda stres se v vsakdanjem življenju pogosto uporablja. Predstavlja nam nekaj, običajno škodljivega, čeprav ga težko natančno opredelimo. Načeloma lahko rečemo, da je stres odziv organizma na zunanje ali notranje dejavnike (stresorje), ki ogrožajo funkcioniranje ali življenje organizma. V organizmu se različne funkcije in vrednosti določenih parametrov uravnavajo s pomočjo specifičnih mehanizmov, npr. mehanizmom za zagotavljanje normalne telesne temperature, arterijskega tlaka, ravnovesja elektrolitov, sestave in volumna tekočin itd. V primeru zagotavljanja normalne telesne temperature bi stresor recimo bil nizka ali visoka temperatura okolja, stres pa ustrezen odziv organizma na omenjeno motnjo.

Stresor (odziv nanj je stres), ki deluje kratek čas in je obvladljiv, omogoča ohranjanje notranjega ravnovesja v organizmu in njegovo preživetje. Odzivi na blage stresne situacije so lahko koristni in pomembno prispevajo k razvoju, učenju in prilagodljivosti organizma na nenehno spreminjajoče se okolje. Izpostavljenost organizma neobvladljivim stresorjem visoke intenzitete ali dolgotrajna izpostavljenost pa lahko ogrozi zdravje organizma. Ko organizem ne more več zagotavljati normalnih fizioloških procesov, nastopijo različne motnje v obnašanju živali in bolezni. Tako lahko dolgotrajna izpostavljenost organizma neobvladljivim stresorjem privede do fizioloških, presnovnih in biokemičnih sprememb v telesu ter s tem spremeni odzivnost in delovanje organizma. To lahko ima velik vpliv na

rezultate poskusov in lahko privede celo do napačnih ugotovitev, ker je odzivnost takšnega organizma omejena ali celo onemogočena. Poleg tega lahko dolgotrajen stres povzroči tudi motnje v obnašanju (zmanjšan libido, zmanjšana ješčnost itd.). V nekaterih primerih je lahko ogroženo celo življenje organizma (npr. podhladitev organizma zaradi nizke zunanje temperature). Prav posebej to velja za dolgotrajen stres. Ta lahko poslabša že prisotno bolezen ali pa privede do razvoja nove bolezni (npr. različne okužbe zaradi oslabiljenega imunskega sistema).

STRESOR IN MEHANIZMI, KI PRIVEDEJO DO STRESA

Na Sliki 1 so prikazani najpomembnejši organi v organizmu, ki so vključeni v stres. Zaznavni centri v centralnem živčnem sistemu preko hipofizno-nadledvične osi in avtonomnega živčnega sistema vplivajo na periferne organe, kar privede do usklajenega stresnega odgovora. Procesi, ki sledijo, omogočajo organizmu prilagoditev (adaptacijo) na spremenjeno okolje. Ta mehanizem je tesno povezan z limbičnim področjem v centralnem živčnem sistemu, ki je odgovorno za obnašanje (agresivnost), emocije (strah), motivacijo, učenje in libido. Vpliva tudi na krvni tlak, srčni utrip, gibanje prebavil, frekvenco in globino dihanja, občutek ugodja, lakote, sitosti in strahu, mehanizme za regulacijo telesne temperature ter spanje (spalni cikel).



Slika 1: Vpliv stresorja na centralni živčni sistem in periferne organe pri stresu.

V času delovanja stresorja centralni živčni sistem povzroči integriran odgovor nanj. Fiziološki odgovor je posledica aktivacije centralnega živčnega sistema, in sicer po dveh poteh: 1.) aktivira se avtonomni živčni sistem in 2.) hormonalni (nevro-endokrini) sistem.

(Povzeto in prirejeno po: Beynen, A. C., Festing, M. F. W., vanMonfort, M. A. J. Behavior, stress and well-being. V: vanZutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, A. C. (ur.). Principles of Laboratory Animal Science. Amsterdam: Elseviersciencepublications, 1993: 75–99).

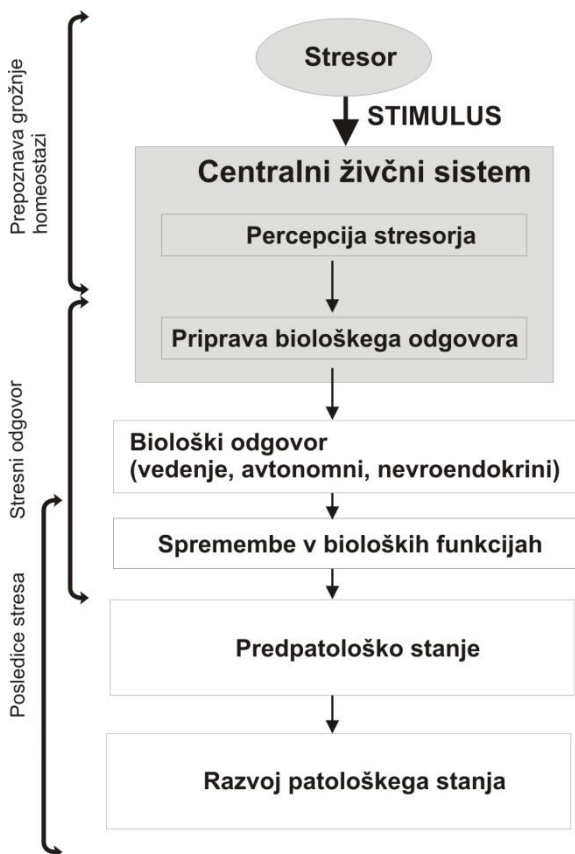
NAJPOGOSTEJŠI STRESORJI

Poznamo dve skupini stresorjev: procesivne in sistemske. Procesivni stresorji so grozeči dejavniki v okolju. Žival v tem primeru s pomočjo čutil spozna, da je ogrožena, in se odzove z borbo ali begom. Sistemski stresor povzroči poškodbo organizma (npr. ugriz, zlom, krvavitev itd.), ki prizadene njegovo homeostazo in povzroči različne motnje, npr. padec krvnega tlaka, hipoksijo, podhladitev itd. Stresor vedno izzove integriran odgovor. Obnašanje živali in fiziološki procesi so pomembni za vzdrževanje ravnovesja (homeostazo).

Motnje v obnašanju in fiziologiji živali so pogosto posledica neustreznega okolja za poskusne živali. Večina živali večino svojega življenja preživi v kletki. Kletka mora za dobro počutje živali nuditi udobje in varnost. Živali se morajo v kletki prosto gibati in imeti ves čas neomejen dostop do hrane in vode. Če prostor ne zadovoljuje zahtev vrste (npr. neprimerne bivalne površine, neustrezne kletke, neustrezne mikrokline, oskrbe ipd.), se živali počutijo ogrožene in posledično pride do stresa. Če je v kletki preveliko število živali oziroma so kletke premajhne, to privede do kroničnega stresa. Do stresa lahko privede tudi neustrezno ravnanje s poskusnimi živalmi (npr. povzročanje bolečine) in na drugi strani postopki, ki se izvajajo zaradi izvedbe poskusa samega (npr. invazivni kirurški poseg brez ustrezne postoperativne analgezije). Ti posegi lahko med drugim bistveno spremenijo presnovne procese, vplivajo na kardiovaskularni in imunski sistem. Stres lahko korenitospremeni fiziološke kazalce in obnašanje živali, ki jih običajno merimo, kar odločilnospremeni raziskovalne rezultate.

STRES IN BOLEZEN

Potencialna nevarnost aktivira nevro-endokrin oos hipotalamus–hipofiza–nadledvična žleza. Hipotalamus preko hipofize (oba sta pomembna dela centralnega živčnega sistema, ki uravnavata izločanje hormonov v telesu) spodbudi nadledvični žlezi k povečanemu izločanju hormonov adrenalina, noradrenalina in kortizola oziroma kortikosterona. Adrenalin in noradrenalin začne izločati sredica nadledvične žleze po tem, ko žival zazna nevarnost (povelje potuje po živcu iz hipotalamusa v sredico žleze izredno hitro). Gre za hormona alarmne reakcije, ki telo živali pripravi na uspešnejši boj ali beg. Pod njunim vplivom se pohitri srčni utrip in krčenje srca ter na ta način pospeši pretok krvi skozi tkiva. Krvni tlak in telesna temperatura se zvišata, dihanje se pospeši in s tem telesu zagotovi povečano količino razpoložljivega kisika.



Slika 2: Potek dogodkov, povzročenih s stresorjem.

Procesi, ki privedejo do patološkega stanja. V tem modelu je odgovor na stresor razdeljen v 3 faze, ki si sledijo: 1. faza: prepoznavanje (ocena) stresorja kot grožnje homeostazi; 2. faza: etološki in fiziološki odgovor; 3. faza: posledice stresa.

(Povzeto in prirejeno po: Beynen, A. C., Festing, M. F. W., vanMonfort, M. A. J. Behavior, stress and well-being. V: vanZutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, A. C. (ur.). Principles of Laboratory Animal Science. Amsterdam: Elseviersciencepublications, 1993: 75–99).

V kri se pospešeno izloča gorivo za dodatno mišično delo (glukoza, maščobne kisline), hkrati pa se kri iz trenutno manj pomembnih delov telesa, kot sta npr. koža in prebavila, preusmeri v tiste organe in mišice, ki so v trenutni situaciji potrebni za boj oziroma beg. Pozornost živali je povečana in usmerjena na pretečo nevarnost, dovzetnost čutil se poveča. Reakcija, imenovana mehanizem borbe in bega, traja le krajši čas. Če se živali uspe umakniti in se ne počuti več ogrožene, se vse fiziološke spremembe vrnejo v normalno stanje (govorimo o akutnem stresu).

V nasprotnem primeru se organizem odziva dalje. Pod vplivom adrenalina in noradrenalina telo porabi rezerve glikogena (iz njega nastaja v mehanizmu borbe in bega krvni sladkor), zato hormona kortizol in kortikosteron poskrbita za nastanek novega krvnega sladkorja. Njuna glavna naloga je pospešiti razgradnjo telesnih snovi (predvsem mišičnih beljakovin) in oskrbeti telo z energijo v obliki krvnega sladkorja. Izloča ju skorja nadledvične žleze. Njuna vloga je zelo pomembna v fazi prilagoditve (adaptacije), ki sledi mehanizmu borbe in bega. V tej fazi hipotalamus s pospešenim izločanjem CRF (Corticotropin Releasing Faktor) vzpodbudi prednji režanj hipofize k povečanemu izločanju hormona ACTH (adenokortikotropni hormon). Večja koncentracija ACTH v krvi vzpodbudi skorjo nadledvične žleze k pospešenemu izločanju glukokortikosteroidnih hormonov, kot sta kortizol in kortikosteron. Ta odziv lahko traja od nekaj minut do nekaj tednov. Organizem preide v stanje kroničnega stresa, ko homeostatski mehanizmi niso dovolj za vzdrževanje normalnih fizioloških procesov v telesu.

V primeru delovanja sistemskih stresorjev na organizem, pri čemer pride do poškodbe tkiv, se razvije vnetje, katerega posledica je bolečina in vedno tudi citokinski odziv. Citokine izločajo nekatere vnetne celice (npr. makrofagi) in celice imunskega sistema. Lokalno in sistemsko povišana koncentracija citokinov, še posebej pri kroničnem poteku vnetja, lahko povzroči dvig telesne temperature, slabo počutje in zmanjšano konzumacijo hrane (vpliv na centre v hipotalamusu), razgradnjo beljakovin v mišicah (znak je zmanjševanje mišične in telesne mase) zaradi zagotavljanja glukoze kot vira energije in aminokislin, potrebnih za regeneracijo in reparacijo poškodovanih tkiv, ipd. Povečana koncentracija citokinov prav tako spodbudi stresni odziv (izločanje ACTH in kortizola), kar je še posebej koristno pri poškodbah tkiv v primeru avtoimunih obolenj, saj kortizol zavira imunski odziv.

Najpogostejši stresorji pri poskusnih živalih so bolečina, stradanje, žeja, prostorska utesnjenost, neustrezna temperatura okolja in hrup. To so vse posledice neustreznega ravnanja s poskusnimi živalmi. Bolečina je načeloma koristen fenomen, ki varuje organizem pred poškodbo, saj sproži ustrezen zaščitni motorični in vegetativni odgovor ali pa opozori na že povzročeno poškodbo. Vendar dalj časa trajajoča in zelo intenzivna bolečina povzroči kronični stres in je tako zelo škodljiva za organizem.

Bolečina in stres sta izraza, ki sta subjektivne narave in razumljiva za lastne občutke pri človeku. Glede na iste fiziološke procese in živčno strukturo pri živalih lahko sklepamo, da tudi živali občutijo bolečino in nelagodje podobno kot ljudje. Razumeti pa moramo, da lahko med posameznimi posegi in živalskimi vrstami obstajajo razlike.

Posledica bolečinskih impulzov je naučen odgovor izogibanja, kar lahko v primeru izvajanja poskusov na živalih spremeni normalen vzorec njihovega obnašanja. To vsekakor vpliva na rezultate izvajanega poskusa, ki v tem primeru niso relevantni. V grobem ločimo več vrst bolečin. Glede na trajanje ločimo akutno (kratkotrajno) in kronično (dalj časa trajajočo) bolečino. Če je npr. bolečina zelo huda, lahko žival izgubi zavest. Ocena stopnje trpljenja živali zaradi bolečine temelji na reakcijah in spremembah obnašanja živali. Ta ocena je žal lahko le subjektivna.

V primeru primarne bolečine (ostra, dobro lokalizirana) so odzivi, ki sledijo, predvsem umikanje povzročitelju – bolečemu dražljaju. To je zaščitni mehanizem. Pri tem pogosto prihaja do akustičnih izrazov bolečine. Po poškodbi oziroma po nastanku sekundarne bolečine (sledi primarni, je neostra in slabo lokalizirana) so odgovori bolj kompleksni. V tem primeru se motorična aktivnost spremeni ali zmanjša tako, da se prepreči dodatna poškodba (npr. šepanje).

Spremembe pri lokomotorni funkciji so pomemben kazalec za oceno stopnje kronične bolečine. Motivacijske spremembe se kažejo v umiku živali na varno mesto in opustitvi večine dejavnosti, razen najbolj nujnih. Zmanjšana budnost ali živahnost, spremenjena drža telesa in nizka motivacija za obnašanja vzdrževanja (npr. hranjenje) so prav tako lahko posledice bolečine. Živali izražajo določene emocije, so apatične in 'depresivne'. Reakcija na bolečinski dražljaj je lahko tudi krik, tuljenje ali cviljenje, pojavi pa se predvsem pri akutni bolečini. Stokanje, ječanje in cviljenje so pogosti pri kronični

bolečini. Zvočni izrazi bolečine služijo tudi kot komunikacijski signali oziroma informacije ostalim prisotnim živalim.

SPREMEMBE OBNAŠANJA IN ZNAKI, KI JIH LAHKO OPAZIMO PRI POSAMEZNIH VRSTAH POSKUSNIH ŽIVALIH V STRESU

Pri miših se stres kaže kot zmanjševanje telesne mase. Miši v stresu spijo veliko več kot navadno. Hujšanje je še posebej izrazito, ko gre za posege, ki jih spremlja bolečina. Dlaka miši, ki imajo bolečine, je nasršena (piloerekcija), živali so zgrbljene in se pogosto izolirajo od preostale skupine.

Podgane so bolj potrpežljive, vendar lahko v primeru ponavljanja stresnih situacij postanejo agresivne. Akutno bolečino pogosto spremljata oglašanje in borbenost. Boleča mesto živali navadno ližejo ali ga varujejo s sedečo držo. Pojavijo se motnje v spanju in podaljša se njegova dolžina. Pogosto je zaradi produkcije vnetnega izločka (eksudata) prisoten tudi rdeč očesni izcedek (chromodacryorrhea), ki vsebuje barvilo hematoporfirin. Budre so čuječe, živahne živali, ki se poskušajo ujetju izogniti oziroma se ne pustijo zlahka ujeti. Znak stresa je že to, da žival otrpne in jo z lahkoto ujamemo. Živali se glasno oglašajo že pri majhni prehodni bolečini, če pa je bolečina huda, je vokalizacija še močnejša in žival poskuša pobegniti. Pri dalj časa trajajoči bolečini so živali videti zaspane, redko se pojavi tudi agresivno vedenje. Budre so stoične živali, zato je težko le bežno ugotoviti, ali je bolečina prisotna. Ugotavljanju tega se je potrebno posebej posvetiti, zato uporabljamo posebno metodo točkovanja bolečine.

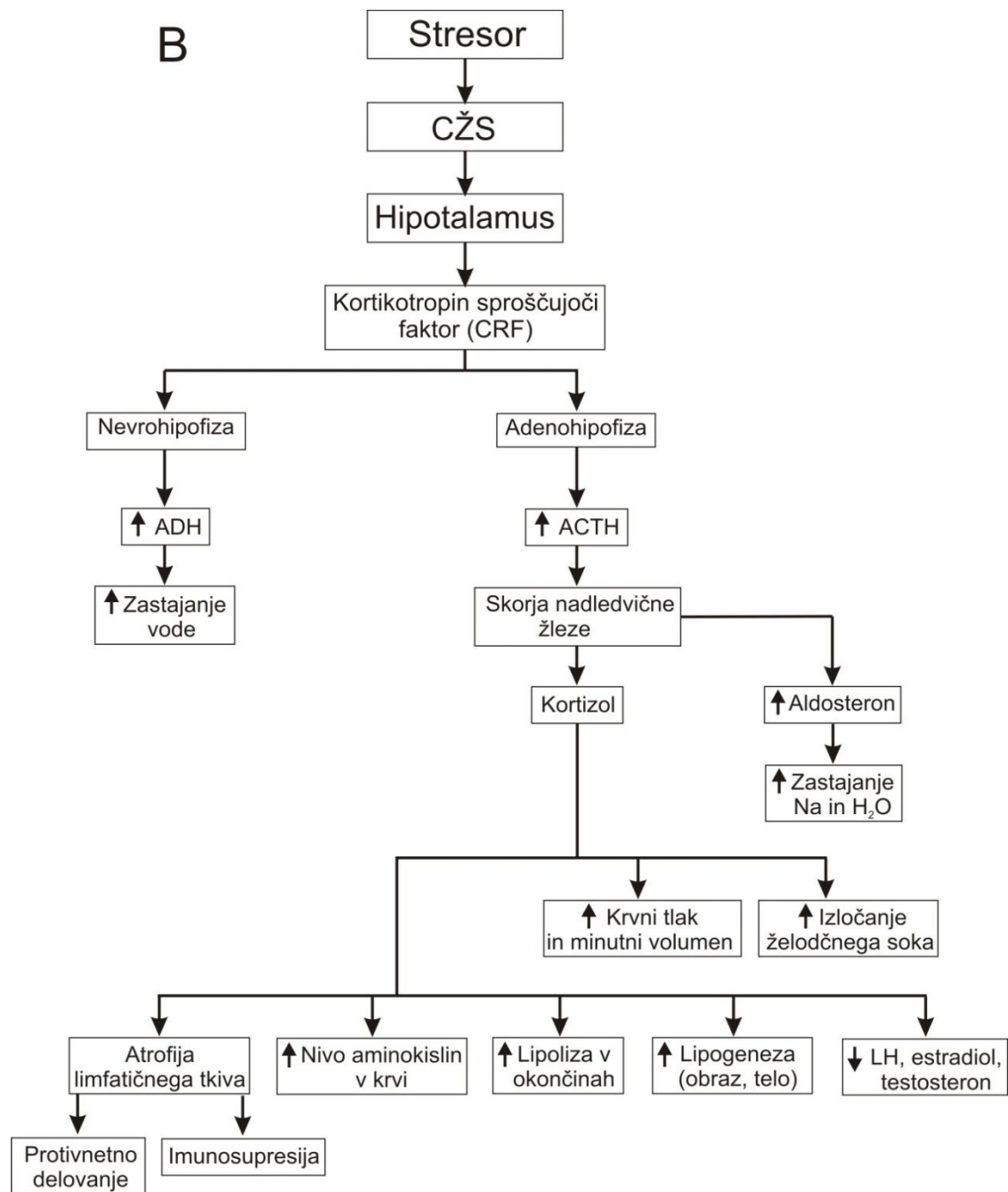
Kunci navzven ne kažejo posebnih znakov bolečine, razen tega, da se manj gibljejo in da uživajo manj vode in hrane. Divji kunec se v naravi v primeru grozečega dejavnika namreč pritaji, kar je verjetno posledica evolucije. Pogosto so prisotni fotosenzitivnost, očesni izcedek in izbočeni tretji očesni vek. Opazimo lahko tudi onesnaženje dlake na koži s fecesom, motnje v prebavi in dehidracijo. Najpomembnejši klinični znaki, ki posredno ali neposredno kažejo na stres pri živalih in pri pojavu katerih je potrebno ugotoviti vzroke ter pogosto takoj ukrepati, so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Nekateri klinični znaki, ki so lahko znak stresa in zahtevajo večjo pozornost, zdravljenje ali celo evtanazijo poskusne živali, da se prepreči trpljenje živali (povzeto po Hau, J., vanHoosier, G. Handbook of laboratory animal science. Essential principles and practices. Volume 1. CRC press, 2003: 464–468).

Anemija	Kaže na izgubo krvi (preko fecesa, urina, rodil) ali slabo obnavljanje eritrocitov do te mere, da se pojavijo klinični znaki, kot so dispneja, hiperventilacija, bledica sluznic in okončin.
Apatija, neaktivnost	Vključuje neaktivnost, utrujenost, ravnodušnost, odpor do gibanja. Stanje je zelo resno, če se pojavi skupaj z izgubo telesne mase, dehidracijo in vdrtimi očmi. Žival opazujemo v času pod rdečo lučjo ali v temi, ko jim aktivnost poraste.
Ataksija, opotekanje	Vzrok je lahko živčno-mišična koordinacija, slabotnost ali obdobje po napadu.
Izguba telesne mase/kondicije, mršavost	Kritično, če TM pade za 20 odstotkov v primerjavi s kontrolnimi živalmi ali za 25 odstotkov v enem tednu; spremlja jo neješčnost; kondicija mora biti ocenjena pri kroničnih stanjih (tumorji), saj lahko TM ostaja enaka, izgublja pa se mišično in maščobno tkivo (tipamo hrbtenico in medenico; pojavi se 'kvadratna' oblika repa).
Težko dihanje (dispneja)	Pojavi se v različnih oblikah – sopihanje, hiperventilacija, abdominalno-torakalno dihanje, hropenje ob vsakem vdihu (kaže na abdominalno bolečino).
Kašljanje, kihanje	Če je stalno, kaže na ponavljajočo se infekcijo.
Dehidracija	Ocenimo jo z dviganjem kože in merjenjem časa, v katerem se kožna guba izravna; pojav zaradi zmanjšane konzumacije ali povečanega izločanja vode (črevesne, ledvične ali endokrine bolezni).
Diareja	Prisotna v različnih oblikah od vodenega ali krvavega fecesa do mehkih iztrebkov. Pogostejša defekacija kaže na povečano resnost stanja. Ocenjujemo tudi telesno maso.
Izcedki	Lahko iz katerekoli telesne odprtine; potrebno je ločiti med različnimi etiologijami in učinki testnih substanc. Sicer se zdrave živali redno čistijo.
Edem	Otekla področja na okončinah, ventralnih delih telesa; lahko kažejo na insuficienco srca ali nizek nivo proteinov v krvi.
Prenehanje hranjenja/pitja	Glej izgubo telesne mase.
Piloerekcija	Dlake na kožuhu stojijo pokonci; kožuh ima grob izgled. Kaže na splošno slabo zdravje in opustitev negovanja.
Samopoškodovanje, srbež	Lizanje, praskanje, drgnjenje bolečega področja; če traja dlje časa, lahko vodi v ulcerativni dermatitis. Če je poškodovano večje področje, žival usmrtime.
Vdrti boki	Lahko posledica abdominalne bolečine ali mršavosti.
Tremor	Trzanje mišic ali hitro premikanje kože.

VPLIV STRESA NA RAZISKOVALNE REZULTATE

Stres lahko bistveno vpliva na raziskovalne rezultate. Rezultati, dobljenih pri živalih, ki so v akutnem ali kroničnem stresu, lahko privedejo do povsem napačnih zaključkov. Takšen primer je hipotetično proučevanje vpliva potencialno zdravilne snovi na kardiovaskularni sistem, kjer se spremljajo npr. parametri, kot so srčna frekvenca, srednji arterijski tlak ipd. Ti parametri so pri živali, ki je v stresu, spremenjeni že sami po sebi. Odzivnost kardiovaskularnega sistema je lahko bistveno spremenjena zaradi številnih učinkov kateholaminov in kortikosteroidov, kot so npr. zmanjšanje števila β -adrenergičnih receptorjev (fenomen znan kot »downregulation«), povečana občutljivost žil na kateholamine ipd. Vpliv simpatičnega in kortizolskega odziva organizma v stresni situaciji na nekatere fiziološke procese je nazorno prikazan na sliki 3A in B.



Slika 3: Simpatični (Slika A) in kortizolski (Slika B) odziv organizma na akutni oziroma kronični stres in njun vpliv na fiziološke procese v organizmu (povzeto po Huether, S., McCance, K. Understanding pathophysiology. 2nd edition. Mosby, 2000: 221).

Dolgotrajen stres lahko privede do sprememb fizioloških parametrov izven normale in po določenem času celo do morfoloških sprememb na organskih sistemih, kar zmanjšuje fiziološke rezerve organov ali vodi v bolezen. Podobno je pri poskusih, kjer se proučuje imunski odziv na določene dejavnike, saj je ta v stresu zaradi zaviralnih učinkov kortikosteroidov bistveno oslavljen.

ZAKLJUČEK

Obveznost človeka kot oskrbovalca živali je zagotavljanje dobrega počutja živali, zato je potrebno dobro poznavanje njihovih potreb in bioloških značilnosti. Praviloma velja, da tisto, kar izzove neprijetne občutke, strah ali tesnobo in bolečino pri človeku, podobno deluje tudi na živali. Vendar pa je potrebno biti dober opazovalec. Potrebe in občutja lahko napačno ocenimo, če ne poznamo dovolj dobro njihovih navad in potreb. Kako lahko torej trpljenje zmanjšamo ali celo preprečimo? Najprej je prav gotovo potrebno živalim nuditi dovolj kakovostne hrane, svežo vodo, dovolj velik ter primeren življenjski prostor z ustreznim mikroklimo, skratka zagotoviti elementarne potrebe živali. Redno je potrebno skrbeti za čiščenje kletk, primerno temperaturo in vlago ter živalim omogočiti normalen dnevni ritem. Živalim lahko stres povzročimo že s tem, da porušimo vzpostavljeno socialno hierarhijo. Če npr. v kletko z že vzpostavljeno hierarhijo med samci vstavimo novega samca, se lahko zgodi, da se živali spopadejo med seboj do te mere, da pride celo do pogina.

Rokovanje z živalmi mora biti korektno in v skladu z etološkimi potrebami poskusnih živali. Zelo pomembno je tudi, da pri redni vsakodnevni oskrbi živalim po nepotrebnem ne povzročamo bolečin. Vsi omenjeni dejavniki lahko v nasprotnem privedejo do stresa.

Moralna obveza je, da z živalmi, ki jih gojimo za različne poskusne namene, ravnamo tako, da jim omogočimo dobro počutje in zadovoljevanje njihovih osnovnih potreb. S tem na najprimernejši način zmanjšamo možnosti za stres.

LITERATURA

1. Beynen AC, Festing MFW, van Monfort, MAJ. Behavior, stress and well-being. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of laboratory animal science. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1993: 75–99.
2. Beynen AC, Festing MFW, van Monfort, MAJ. Recognition of pain and distress. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of laboratory animal science. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1993: 255–65.
3. Bresjanac M. Bolečina. In: Ribarič S, ed. Temelji patološke fiziologije. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2009: 263–70.
4. Broom DM, Johnson KG. Stress and animal welfare. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993: 57–86.
5. Hau J, Van Hoosier G. Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices. Volume 1. Boca Raton: CRC Press, 2003: 464–8.
6. Huether S, McCance K. Understanding pathophysiology. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 2000: 221 str.
7. Sketelj J. Nespecifični obrambni odziv organizma na stres. In: Ribarič S, ed. Temelji patološke fiziologije. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2009: 58–62.
8. Wolfensohn S, Lloyd M. Textbook of laboratory animal management and welfare. Oxford: Oxford University Press, 1994: 174–80.

UVOD

Glede na vse večjo uporabo laboratorijskih poskusnih živali in razmeroma slabo poznavanje obnašanja teh živali v »ujetništvu« oziroma laboratorijskih pogojih se je pokazala vse večja potreba po poznavanju temeljnih značilnosti njihovega obnašanja. Do sedaj je bilo obnašanje poskusnih živali preučevano predvsem pri primatih, živečih v ujetništvu, zakonodaja je v svetu predpisovala bivalne pogoje predvsem za te živali ter poskusne pse in mačke. Veliko raziskav je bilo opravljenih glede nenormalnega in neželenega obnašanja poskusnih in spremljevalnih mesojedih živali. Le malo raziskav je bilo opravljenih na preučevanju posebnosti normalnega in atipičnega obnašanja »standardnih« vrst laboratorijskih živali. Literatura večinoma opisuje učinke in vplive določenih lastnosti in tipov obnašanja laboratorijskih živali, ki bi lahko vplivali na poskuse, ki se izvajajo na teh živalih, ter posledičnih obogatitev okolja in izboljšanja tehnik njihove vzreje. Avtorji so si enotni v ugotovitvi, da je zelo težko ugotoviti, kakšno obnašanje odstopa od tistega, ki se razumeva kot normalno, v kolikor upoštevamo, da laboratorijske živali živijo v specifičnih pogojih. Zakonodaja v Republiki Sloveniji, ki izhaja iz evropske zakonodaje, jasno predpisuje zahtevo, da je potrebno vse omejitve, ki bi lahko vplivale na fiziološke in etološke potrebe laboratorijskih živali, zmanjšati na minimum, kar izhaja že iz zahteve evropske direktive: Council Directive 86/609/EEC. Skrb za laboratorijske živali pa žal ni le etičnega pomena, temveč izvira tudi iz povsem praktičnih znanstvenih spoznanj, da lahko slabo počutje in s tem mnogokrat spremenjeno obnašanje vplivata na imunološke in fiziološke spremembe laboratorijskih živali, kar pomembno vpliva na rezultate raziskav. Znano je na primer, da ima centralni živčni sistem pomemben in značilen vpliv na imunski sistem živali. Iz tega razloga je obogatitev okolja, ki nedvomno vpliva na splošno ugodje živali in s tem pozitivne reakcije centralnega živčnega sistema, pomemben dejavnik pri razvoju možganov, spominu, sposobnostih učenja, reševanju problemov in socialnih interakcijah s človekom in vrstniki. Obogateno okolje zmanjša podhranjenost in podaljša življenjsko dobo živali, pospeši rekonvalescenco možganskih poškodb, zniža možnost nastajanja možganskih tumorjev, spremeni LD₅₀, poveča odziv na poskuse z zdravili in vpliva na razvoj ateroskleroze.

Potrebe živali so se do sedaj ugotavljale na naslednje načine. Opazovanje živali in posledično oblikovanje etograma obnašanj je pripomoglo k razumevanju značilnih in potrebnih oblik obnašanja posameznih vrst laboratorijskih živali. Preučevanje živali v različnih pogojih in tipih okolij je privedlo do končnega oblikovanja »zlate sredine« oblik normalnega in za preživetje potrebnega obnašanja. Tak pristop je na podlagi opazovanih interakcij živali z okoljem ter predmeti v teh okoljih omogočil »načelne ugotovitve« oblik normalnega obnašanja posameznih vrst živali. Vendar tudi danes ni povsem jasno, ali niso morda opazovanja velikokrat subjektivne narave in premalo objektivna za realno oceno. Za približno realne ocene v preučevanju normalnega obnašanja so zato uporabili metodo preferenčnih testov, kjer živali same izbirajo in odločajo o načinu in količini ponujenih možnosti elementov predmetov izbire. Ti testi so se pokazali kot zelo dober pokazatelj živalskih potreb in preferenc.

Probleme v obnašanju živali v ujetništvu iz navedenih razlogov lahko delimo na kvalitativna in kvantitativna odstopanja od normalnega obnašanja. Razdelitev namreč vključuje vrste obnašanj, ki na določen atipičen stimulus po svoji količini in jakosti zelo odstopajo od normalnih tipov obnašanja, oziroma se določena, sicer tipična oblika obnašanja sploh ne pojavi. Poleg tega so lahko ta obnašanja usmerjena k nepravim ciljem, na primer k nepravemu predmetu ali sovrstniku.

Nesorazmerja med dražljaji in odgovori vodijo v adaptacijo in s tem prilagajanje na nastale situacije, kar največkrat spremeni obnašanje živali do te mere, da le-to preide v nenormalno, pogosto ekscesivno in ponavljajoče obnašanje. Slednjega imenujemo stereotipija, za katero ni znano, ali pomeni nenormalno obnašanje kot odgovor na stres ali lajšanje stresa. Stereotipije se največkrat pokažejo z različnimi oblikami lokomotornih in gibalnih znakov obnašanja in s specifičnimi držami in položaji telesa. Njihov pojav je povezan s številnimi dejavniki, kot so nevrolška predispozicija, izpostavljenost stresu, slabi pogoji v okolju in frustracije. Če se enkrat pojavijo, jih je zelo težko odpraviti, najbolje je, da se

prepreči njihov nastanek z zagotavljanjem pogojev okolja, v katerem bodo živali izražale svoje tipične oblike obnašanja.

Cilja izboljšanja bivalnega okolja sta torej zniževanje možnosti pojavljanja nenormalnega obnašanja in stimuliranje različnih oblik tipičnega obnašanja. Kakšno okolje je pravo za posamezne vrste laboratorijskih živali, je razmeroma težko ugotoviti. Spremenjeno obnašanje zaradi spremembe okolja, v katerem se znajde žival, ne pomeni vedno izboljšanja pogojev, temveč se lahko ena stereotipija nadomesti z drugo. Iz tega razloga je zelo pomembno poznati vrstno specifično in tipično obnašanje živali, skladno z uvedbo programa za izboljšanje bivalnega okolja in s tem dobrega počutja živali.

GLODAVCI

Podgane in miši so najbolj uporabljani sesalci, namenjeni laboratorijskim poskusom. Med ostalimi vrstami glodavcev so budre in hrčki prav tako številno zastopani med vrstami laboratorijskih živali. V zadnjih petnajstih letih se je način vzreje glodavcev za laboratorijske namene zelo izboljšal. Glodavce človek že prek 100 let vzreja v ujetništvu, zaradi česar se je vrsta v nekaterih primerih že prilagodila tem pogojem, v številnih pogledih pa obdržala načine obnašanja, ki jih imajo sicer divji glodavci, živeči na prostem. Pogoje vzreje v ujetništvu so v marsičem prilagodili značilnim oblikam obnašanja in potreb, ki jih imajo prostoživeči glodavci. To je sicer izboljšalo pogoje bivanja, vendar je enotna oblika zaprtega bivalnega okolja preveč posplošena, v kolikor upoštevamo, da je glodavcev več kot sto vrst, saj posamezne vrste zahtevajo različne oblike in tipe okolja.

1. MIŠI

Obnašanje in vplivi na obnašanje miši

Miši prikazujejo široko paleto različnih oblik obnašanja. So socialne živali, katerih feromoni igrajo pomembno vlogo v komunikaciji, estrusu in spolnem obnašanju. Obnašanje miši je odvisno od genotipa živali in okolja, v katerem žive (Garner, 2002). Normalno obnašanje in stereotipije so največkrat odvisni od tipa okolja, oblikovanja kletk in njihove opremljenosti. Miši so v klasičnih kletkah zelo podvržene žvečenju žice, skakanju in kroženju okrog vogalov kletke, žvečenju nastila in opreme ter kopanju. Značilne so razlike v načinu obnašanja med posameznimi vrstami miši. Gole miši skačejo intenzivneje in višje, prav tako žvečijo močnejše. Samci vrste BALB/c so na primer nagnjeni k agresivnosti in bojem, z visoko prevalenco grizenja v predelu glave, vratu, ram, bokov, perineuma in repa. Nekatera obnašanja se da spremeniti z uporabo različnih vrst nastila in z opremo v kletki, kot so na primer prazne steklenice in tuneli za počitek. Pri določenih vrstah miši (ICR) uporaba kartonskih cevi v kletki bistveno zniža slo po žvečenju žice. Cev jim nudi zatočišče in občutek varnosti. Pri drugih vrstah (BALB/c in Crl:NMRI) se z uporabo PVC cevi, materiala za gnezdenje in železne mreže poveča sla po plezanju in hranjenju. In zopet, če miši vrste BALB/c več plezajo in se gibljejo od vrste NMRI, slednje več počivajo in se bolj negujejo.

Grizljanje dlake in žvečenje brk je naslednji problem nenormalnega obnašanja pri miših, ki lahko privede do popolne izgube dlake na celotnem hrbtu in zgornjem delu vratu. Gre za nenormalno in pretirano obliko socialnega obnašanja, lastnega predvsem dominantnim mišim v kletkah, pogosto se pojavlja pri parih miši, preseljenih v drugo kletko, ko ti pričnejo medsebojno negovati drug drugega. Podrejene živali se pustijo negovati in so k pretirani negi te vrste celo nagnjene oziroma so ji privržene. Druga oblika izgube dlake je alopecija, ki se pri laboratorijskih miših pojavlja okrog smrčka. Je posledica vtikanja glave med mrežo, kadar se hranijo iz krmilnikov, ki so nameščeni zunaj kletk. Alopecija se takrat pojavlja le okrog smrčka.

Naslednja oblika obnašanja, ki bi ji sicer težko pripisali odklon od normalnega obnašanja, je agresivno obnašanje. Slednja je problematična predvsem za podrejene živali, ki so zato pogosto pogrizene. Predvsem so prizadeti določeni deli telesa: rep, križni del hrbtenice, ušesa in ramena. Agresija se poleg razloga, da se vzdržuje hierarhija, pogosto pojavlja tudi med samci in samicami, še posebej kadar branijo podmladek. Nagnjenost k agresiji je v večji meri lastna predvsem vrstam C57BL/10 in DBA/2, TO in švicarskim mišim, medtem ko so vrste CBA/Ca, C3H/He milejše narave. Nagnjenost k agresiji se

razvije že v intrauterinem obdobju, ko se zaradi različnega lokalnega placentalnega transferja hormonov nekateri zarodki razlikujejo v razvoju.

Miši za zaznavanje okolja intenzivneje uporabljajo vonjalna čutila kot čutila vida ali sluha. Pri čiščenju kletk se dostikrat pojavi nov boj za hierarhijo, saj se z namestitvijo novega svežega nastila ali čiščenjem tal, opreme in kletke izgube markirni sledovi. Nekaterim vrstam miši je zato bolje pustiti umazano kletko tudi 4–6 dni ali prenesti del umazane stelje. To je lahko pomembna ugotovitev za tehnologijo vzreje miši, obenem velja ob teh dejstvih razmišljati tudi o načinu ventilacije kletk.

Agresija zavira izločanje hipofiznih hormonov, reproduktivnih, gonadotropnih in adrenokortikotropnih (ACTH) hormonov, vpliva lahko tudi na raven kateholamina nadledvične žleze. Raven kortikosteronov se poveča pri podrejenih živalih, še posebej v slabih bivalnih pogojih, enako se poveča tudi pri dominantnih živalih, kadar morajo te obvladovati velik teritorij. Agresija dominantnih živali pa je v skupinah lahko še izrazitejša, kadar se zaradi poskusov dominantne živali iz kletke začasno odstrani in se jih zopet vrne. S primerno obogatitvijo okolja, kjer imajo živali dovolj prostora za gibanje, umik in zaščito, se lahko agresivno obnašanje spremeni v povsem umirjeno. Možen ukrep za zmanjšanje problemov z agresijo je tudi vseljevanje in skupinsko nameščanje manj agresivnih živali in ločevanje zelo agresivnih živali. Agresivnost je mogoče znižati z združevanjem po spolih.

Obogatitev okolja

Obogatitev bivalnega okolja je izrednega pomena pri uspešnosti uporabe laboratorijskih živali v poskusih. Velike razlike se na primer pokažejo že pri individualno oziroma skupinsko nameščenih miših. Individualno nameščene imajo v primerjavi s skupinsko nameščenimi manj razvit imunski sistem, razvoj različnih tumorjev je hitrejši. Zanimiva je na primer ugotovitev, da v revnem okolju miši večinoma spijo tako, da se tiščijo druga poleg druge, medtem ko se v obogatenih okoljih tiščijo le v parih ali manjših skupinicah.

Precejšnje število poskusov je bilo opravljenih za ugotavljanje najustreznejših tal za vzrejo glodavcev. Tradicionalni sistem vzreje glodavcev poteka na žičnatih tleh, ta so sčasoma nadomestili s čvrstimi tlemi. Kadar imajo miši priložnost izbire med žičnatim podom oziroma čvrstimi tlemi, nastlanimi z raztrganim papirjem (preferenčni testi), vedno izbirajo varianto čvrstih tal. V poskusih se je ugotovilo tudi, da miši v kletkah z mešanim tipom tal, kjer jih je bila polovica iz žičnate mreže, polovica pa čvrsta, najraje počivajo na polnih tleh, mrežna tla pa uporabljajo za defekacijo in uriniranje. Ugotovili so tudi, da miši v obogatenem okolju za iztrebljanje uporabljajo bolj ali manj ista mesta, kar ni primer pri uporabi tal iz žičnate mreže. V preferenčnih testih izbire nastila so ugotovili, da miši vseh vrst raje izbirajo trgi papir kot lesne oblace, žaganje zopet manj kot obe predhodno ponujeni vrsti nastila. Glede na nagon, ki ga imajo miši za gradnjo gnezd, ima trgi papir očitno najvišjo stopnjo preference (papirnati robci, papirnate brisače), čeprav je kombinacija različnih vrst nastila verjetno prav tako ustrezna. Gradnja gnezda je pri miših del vrstno tipičnega obnašanja in se kaže kot potreba, zato kletke z že zgrajenimi gnezdami za miši niso tako zanimive kot tiste, v katerih si gnezdo gradijo same. Po drugi strani pa je res, da so omenjeni materiali za nastil izredno vpojni, kar ni vedno koristno. Velika vpojna moč nastila lahko na primer dehidrira novorojeni podmladek.

Okolje je mogoče obogatiti na različne načine. Skupinsko nameščenim mišim se v kletko navadno namestijo izpraznjene in sterilne konzerve (upoštevati je potrebno rjavenje in poškodbe), steklenice, plastične cevi, kose mehkega lesa in kartonaste cevi. S temi oblikami obogatitve se zmanjšata agresivnost, strah in poveča nagnjenost k raziskovalnemu obnašanju in čuječnosti. Ne glede na obogatitev okolja na omenjene vedenjske vzorce vpliva tudi vrsta miši. Na primer BALB/c so plašnejše od C57BL miši.

2. PODGANE

Obnašanje in vplivi na obnašanje podgan

Podgane so za mišmi druga najbolj uporabljana vrsta glodavcev v poskusih. Iz tega razloga je bilo tudi pri tej vrsti glodavcev opravljenih veliko poskusov obogatitev okolja. Podgane so nočne živali z dobro izraženim cirkadianim ritmom. Aktivne so v jutranjih urah, manj v popoldanskih. So koprofagne živali. Značilni za njihovo naravno obnašanje so radovednost, raziskovalnost, kopanje, agresija, napadalnost,

plezanje, skakanje, valjanje, igrivo mikastenje in preganjanje. Komunikacija med podganami poteka na podlagi slišnih zvokov in na ravni ultrazvoka (22 kHz), pri čemer je ta komunikacija še posebej pomembna v obdobju mladičev po porodu. Testi izbire so pokazali, da so podgane zelo čuječne živali in prikazujejo raziskovalno obnašanje za nove predmete, so zelo družabne in socialne ter živijo v definiranih, stabilnih skupinah. Znano je, da so individualno nameščene podgane bistveno bolj podvržene boleznim, če so prenaseljene in neprilagojene na določeno okolje. V teh primerih so podgane precej neudomačljive, ob tem se jim povečata nadledvična žleza in ščitnica, medtem ko se teži vranice in timusa znižata. Zniža se tudi toleranca na toksine, kar se pokaže z znižano LD₅₀. Učinki socialne izolacije so izrazitejši pri samcih kot pri samicah, čeprav se pri slednjih kaže večja nagnjenost k obnašanju pobega in žvečenju predmetov. Individualna vzreja podgan očitno bistveno vpliva na fizično in psihično stanje živali, kar lahko v precejšnji meri vpliva na izvedbo poskusov. Ugotovili so namreč precejšnje razlike razvoja možganov pri individualno ali skupinsko nameščenih podganah, kažejo se razlike v morfoloških in fizioloških lastnostih (zviševanje srčnega utripa, krvnega pritiska, telesne temperature), sposobnosti učenja in spominu, reševanju problemov, rekonvalescenci, želodčnih ulceracijah in splošnem povečanju ravni kortikosteroidov (Fox *et al*, 2002).

Obogatitev okolja

V preferenčnih testih so ugotavljali, kakšna višina kletk je najprimernejša za samce in samice. Ugotovili so, da imajo podgane raje nižje kletke, vpliv svetlobe na podgane je različen. Vse, še posebej pa albino podgane, imajo raje šibkejšo svetlobo. Uporaba tal iz žičnate mreže je podganam zanimivejša, če so mrežne odprtine majhne (npr. 10 mm × 10 mm), kletka je bolj zanimiva, če se v njej nahajajo plastične cevi in različni leseni podstavki, ki služijo plezanju in zaščiti. Kot obogatitev okolja je v podganih kletkah mogoče uporabiti tudi stare mišje kletke. Podgane rade glodajo lesene palice, škatle in podobno opremo, izglodajo si odprtine, ki jim služijo za zadovoljitev obnašanja bega. Rade se zaposlijo in si hrano raje poiščejo ter se do nje prebijejo prek ovir, kot da jim je ponujena, zelo rade luščijo zrnje. Podgane imajo raje čvrsta kot žičnato-mrežna tla. Pri preferenčnih testih so ugotovili, da na čvrstih tleh počivajo 88 odstotkov časa, na mreži pa le 12 odstotkov. Vendar se v aktivnem obdobju na obeh vrstah tal zadržujejo enako dolgo, medtem ko za iztrebljanje raje izbirajo mrežna tla. Kljub temu so ugotovili, da vrsta tal ne vpliva bistveno na njihovo počutje. Kolikor so podgane na čvrstih tleh, se pri izbiri nastila raje odločajo za trgani papir kot žaganje. Nastil z večjimi delci, ki ga podgane lahko premikajo, je morda tudi orodje za ustvarjanje ultrazvočnih signalov, ki služijo medsebojni komunikaciji.

Podganam je v kletki zelo pomembno gnezdo, saj se v njem zadržujejo 60–80 odstotkov dneva, zato so kletke s plastičnimi gnezdami, ki jih ne morejo zgristi, dosti ustrežnejše kot kletke brez gnezd. Agresivnost je pri določenih vrstah podgan izrazitejša (rjava norveška podgana, F-344) kot pri vrsti Sprague-Dawley (CD; SD). Na zmanjšanje agresivnosti se da vplivati s pazljivo in prijazno oskrbo, kar med drugim zniža tudi številnost poškodb oskrbovalcev (ugrizov).

3. BUDRE

Vplivi na obnašanje

V primerjavi s številom raziskav, opravljenih na miših in podganah, je bilo do sedaj opravljenih razmeroma malo raziskav obnašanja budre. Budre so socialne živali, z najbolj izraženo aktivnostjo ob mraku in zori. Faze počivanja so kratke dobe spanja in kratki počitki. Budre v skupinah rade ležijo skupaj, niso agresivne (razen samic, kadar imajo podmladek), če se ustrašijo, bežijo v zavetje, znak stresa izražajo s cviljenjem z drgetanjem. Individualna namestitve lahko povzroči atrofijo reprodukcijskih organov, samcem upade raven testosterona in kortikosteroidov, upade tudi teža nadledvične žleze. Hierarhija je hitreje ustvarjena in čvrstejša pri samicah. Budre markirajo teritorij z uriniranjem in izločki kavdalnih in suprakavdalnih žlez (Beynen, 1993). Teritorij označujejo z zvoki in agonističnimi kretnjami ter občasnimi boji. Večinoma jedo, počivajo in se gibljejo v skupinah, gibljejo se ob robovih kletk, manj po sredini, kletko nerade prečkajo po sredini. Medsebojna komunikacija poleg človeku slišnih zvokov poteka tudi z ultrazvočnimi glasovi. Budre se oglašajo z 11 značilnimi

zvoki v 5 funkcionalnih kategorijah, in sicer z: 1. zvoki, ki pozivajo sosednjo žival; 2. zvoki, ki pozivajo k vzdrževanju kontakta; 3. zvoki za ponovno vzpostavitev stika; 4. zvoki distresa; 5. alarmnimi zvoki.

Obogatitev okolja

Budre imajo najraje čvrsta tla z globokim nastilom, v katerega se lahko skrijejo. Veliko nastila pojedjo, glodajo leseno in drugo opremo v kletki. Slednje se prepreči, če se za glodanje v kletko namesti nadomestni kos materiala (npr. lesena deščica, palica). Glede na dejstvo, da gre za oralne stereotipije, je vprašanje, če z uvajanjem nadomestnega kosa materiala za glodanje ne nadomestimo ene stereotipije z drugo. Ker so budre plašne živali, je primerno, da se v kletko namesti oprema (cevi, škatle ipd.), ki bo omogočala, da se skrijejo.

KUNCI

Obnašanje in vplivi na obnašanje

Laboratorijski kunci so dnevne živali, za razliko od prostoživečih vrst, ki so nočne živali. Glede na utesnjenost kuncev v kletkah je njihovo obnašanje le omejeno izraženo. Prav zaradi omejenosti izražanja normalnega obnašanja obstaja veliko tveganje, da kunci pričnejo izražati nenormalne oblike vedenja. Žvečenje kletke in druge opreme lahko pripelje do loma zobovja, izražena je pretirana osebna nega, gastrointestinalne motnje, polidipsija in sekundarna poliurija. Guganje in tkanje, vertikalno drgnjenje ali tiščanje nosu med reže kletke, tiščanje glave v steno kletke, pretirano kopanje po nastilu in hitro kroženje so stereotipije, ki se razvijejo pri kuncih. Pretirana pasivnost s sedenjem z ukrivljenim hrbtom ali sedenje s sklonjeno glavo proti kotu kletke sta prav tako obliki značilnih stereotipij kuncev v ujetništvu. Neaktivnost, ležanje, nedokončani vedenjski vzorci in gibi so v primerjavi s skupinsko nameščenimi kuncem izrazitejši pri individualno nameščenih kuncih. Tudi agresija je manj izražena pri skupinsko nameščenih živalih.

Nenormalno obnašanje kuncev velikokrat izvira iz normalnega obnašanja v naravi. Nenormalno kopanje tal je verjetno posledica potrebe po kopanju lukenj v naravi. Pretirano kroženje pa je verjetno posledica siceršnjega izkazovanja agresivnega obnašanja ali dvorjenja.

Obogatitev okolja

Za kunce so največja obogatitev okolja zagotovo predmeti za glodanje in žvečenje. Kot obogatitev okolja se uporabljajo plastične igrače, prazne kartonske škatle, pločevinke, žoge in podobno. Socialna struktura je pri kuncih zelo izražena, še posebej pri samicah. Najlaže se ustvari pri odrasčajočih živalih. Kljub ustvarjeni hierarhiji ni razlik v psihofiziološkem statusu dominantnih in podrejenih živali. Agresija je zelo izražena zlasti pri starejših samcih.

LITERATURA

1. Garner, J. P. Evidence for a relationship between cage stereotypes and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behavioural Brain Research* 136, 2002: 83–92.
2. Fox, J. G. in sod. *Laboratory Animal Medicine*, 2. izdaja. Elsevier Sci. 2002. 1256.
3. Beynen, A. C., Festing, M. F. W., van Monfort, M. *Biology and husbandry of laboratory animals*. V: van Zutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, A. C. (ur.). *Principles of Laboratory Animal Science*. Amsterdam: Elsevier science publications, 1993: 17–47.

ZAŠČITA ŽIVALI

Človek za prehrano uporablja veliko različnih vrst živali, prav tako jih uporablja za krzno in druge, predvsem ekonomske namene ter za poskuse. Veliko število živali ima drugačno vlogo – vlogo družnih živali –, kar polovica gospodinjstev razvitega sveta ima vsaj eno družno žival.

V velikem delu sveta živali tudi še danes nimajo nikakršnih pravic, kaj šele zaščite, pri čemer so izpostavljene številnim škodljivim dejavnikom, boleznim, stresu in poškodbam. Čeprav urejevanje problematike na področju zaščite živali izvira že iz 19. stoletja, so bili pristopi in vsebine za urejevanje te problematike različni, imeli pa so skupni imenovalec, da je vsaka krutost nad živalmi, ki je moralno sporna, prepovedana in mora biti kaznovana. V Veliki Britaniji je bil že leta 1911 osnovan akt o zaščiti živali, ki je predstavljal osnovni model za ostale predloge, dokumente in zakone, ki so bili sprejeti v prihodnosti. Bistvo vsebine akta je prepoved vsakršnega nasilja nad živalmi. Ob ustanovitvi Evropske unije v Rimu l. 1957 so se živali uvrščale med tako imenovano »dobro (blago)« in kmetijske pridelke, zato se v ničemer ni upoštevalo njihovega dobrega počutja. Šele leta 1997 so na »vrhu EU« v Amsterdamu sprejeli zavezujoči protokol na področju dobrega počutja živali, ki članice EU zavezuje k zagotavljanju zaščite in upoštevanju dobrega počutja živali kot čutečih bitij, sprejemanju in uvajanju politike in zakonodaje na področjih, ki zadevajo zaščito in dobro počutje živali.

Danes je zakonodaja v EU uveljavljena na naslednjih področjih dobrega počutja živali:

- transport,
- zakol,
- vzreja kokoši,
- vzreja telet in prašičev,
- poskusi na živalih,
- ribolov z visečimi mrežami,
- zaščita tjušnjev,
- pasti za živali,
- zaščita divjih ptic,
- živali v živalskih vrtovih.

Od leta 1968 je bilo sprejetih 5 konvencij na področjih:

- transporta živali,
- vzreje živali,
- zakola živali,
- skrbi za spremljevalne (družne) živali,
- zaščite poskusnih živali,

ki temeljijo na osnovnih svoboščinah živali upoštevajoč temeljno načelo, da »živali, ki jih človek izkorišča v različne namene, ne izpostavlja nepotrebnemu trpljenju ali ogroža njihovega zdravja.«

DEFINICIJA DOBREGA POČUTJA ŽIVALI

Ideja o zaščiti živali je zasnovana na načelih humanega odnosa in spoštovanja do živali, njihove fizične in mentalne celovitosti. Živali na različne načine služijo človeku, zato je ta odgovoren za izpolnjevanje obvez, ki jih ima do živali, kar je human odnos, ki je odločilnega pomena za dobro počutje živali. Preučevanje in vrednotenje dobrega počutja živali je znanstvena metoda, ki opredeljuje področja

preučevanja kakovosti življenja živali. Je stanje, ki nam je poznano, vendar ga je težko razložiti, zato so tudi pogledi na dobro počutje živali zelo različni. Šele v zadnjem času človek živali upošteva kot čuteča bitja, kar je moralno etično stališče vseh urejenih družb. Kot pri ljudeh se tudi pri ocenjevanju dobrega počutja živali upoštevajo številni dejavniki, med katerimi so najpomembnejši: zdravje, zadovoljevanje potreb in dolgoživost. Za življenje so slednji dejavniki med najpomembnejšimi, zato lahko dobro počutje, ki ga nekateri imenujejo tudi blaginja (angl. »welfare«), definiramo kot posebno vrednoto, ki opredeljuje skrb za živali. Dobro počutje živali je termin in družbena norma glede na skrb za dobro počutje živali, ki se jih izkorišča v človekovo korist. V svetu je odnos do živali zelo različen in odvisen predvsem od kulturnega okolja, razvitosti, izobrazbene ravni in standarda. Osnovno načelo upoštevanja dobrega počutja živali je upoštevanje dejstva, da postaneta dobro počutje in etična odgovornost do živali najpomembnejša dejavnika ne glede na uporabo živali, zato se morajo za dobro počutje in zaščito živali bistveno bolj upoštevati lastnosti in potrebe živali kot le tehnične rešitve za namestitve živali, upoštevati je treba razmerje med zdravjem in dobrim počutjem živali ter tudi temeljne svoboščine živali, seveda ob doslednem upoštevanju pravil pri uporabi živali v znanstvene namene. Pomen skrbi človeka za živali temelji na zagotavljanju kakovosti življenja živali, deli pa se na telesno blaginjo (zagotavljanje zdravja, preprečevanje telesnih poškodb) in mentalno (psihično) dobro počutje (ustrezno psihofizično stanje živali, prikazovanje tipičnih oblik obnašanja, odsotnost stresa, enostavna adaptacija). V kolikor so navedeni pogoji življenja zagotovljeni, lahko trdimo, da je dobro počutje živali kvalitetno, pri čemer živali kažejo visoko raven bioloških funkcij, ne trpijo in se zlahka prilagajajo v okolju, ki jim nudi ustrezno udobje. Vsekakor je dobremu počutju živali zadoščeno šele takrat, ko so izpolnjene njihove fizične in mentalne potrebe. Pogosto se dogaja, da sicer zdrave in fizično zadovoljene živali kažejo znake dolgočasje, stereotipij oziroma pretiranih oblik sicer normalnega obnašanja. Zato je pogosto težko sklepati, kdaj so živali prizadete. Obnašanje živali velikokrat ne pokaže njihovega dejanskega občutenja.

NAČELA ZA ZAGOTAVLJANJE DOBREGA POČUTJA ŽIVALI

Brambellovo poročilo, ki so ga objavili na podlagi raziskav o potrebah živali, je že leta 1966 vsebovalo priporočila glede moralnih obveznosti človeka do živali. Svet za dobro počutje farmskih živali Združenega kraljestva je zato na tej podlagi predlagal naslednjih pet temeljnih svoboščin živali:

- pravica živali, da ne trpijo žeje ali lakote, tako da imajo redno na voljo dovolj hrane in vode za vzdrževanje zdravja in kondicije;
- pravica živali, da ne trpijo zaradi toplotnega ali fizičnega stresa, tako da imajo zagotovljeno ustrezno zaščito pred vplivi okolja in ustrezno namestitve;
- pravica živali, da ne trpijo zaradi bolečin, poškodb ali bolezni, tako da imajo zagotovljeno redno veterinarsko oskrbo;
- pravica živali, da izražajo normalno obnašanje, tako da imajo za to zagotovljene pogoje prostora in družbo sovrstnikov;
- pravica živali, da ne trpijo zaradi strahu in stresa, tako da se jim zagotovijo ustrezni pogoji in z njimi ravna na način, ki odvrča njihovo mentalno trpljenje;

ki veljajo kot splošen vzorec za dobro počutje vseh živali, tudi živali v poskusih, ne le farmskih.

KONCEPTI IN PRISTOPI K DOBREMU POČUTJU ŽIVALI

Veliko število tez dokazuje, kdaj je dobro počutje živali ustrezno, toda dejansko se upoštevata dve različni razlagi. Prva zagovarja biološko smer, ki je vezana na odsotnost fiziološkega stresa. To pomeni, da se je žival sposobna prilagoditi okolju, kadar so ji zagotovljene vse fiziološke potrebe. Razlaga je smiselna, saj je zadostitev fizioloških potreb življenjskega pomena. Toda ali je dobro počutje živali vezano le na mehanizme preživetja? Ker vemo, da ni tako, je potrebno upoštevati tudi občutja živali. V kolikor bi upoštevali le teorijo filozofa Descartesa, bi živalim nudili dobro počutje le z zadovoljitvijo njihovih fizioloških potreb, saj je po njegovi teoriji žival le »avtomat« brez občutij. To seveda ne drži,

zato je kot nadgradnjo biološke razlage nujno upoštevati tudi občutja živali. Ker je študij dobrega počutja živali znanstvena metoda, jo je potrebno tudi ustrezno utemeljiti. Obstajajo trije temeljni koncepti in pristopi.

Prvi koncept razlaga da se živali dobro počutijo v okolju, ki jim omogoča njihovo tipično in naravno obnašanje. To pomeni, da je dobro počutje živali ustrezno (kvalitetno), če jim nudimo pogoje okolja, kjer lahko prikazujejo vse oblike obnašanja kot njihovi divji, v naravi živeči predniki. Dober primer je reja goveda na paši, kjer domala v celoti izvaja vse oblike obnašanja, značilne za vrsto. Prav ta zmožnost je glavno izhodišče za ocenjevanje dobrega počutja po prvem konceptu.

Drugi koncept temelji na ocenjevanju zmožnosti prilagajanja živali na okolje. Nekateri avtorji ocenjujejo dobro počutje kot stanje živali ob prilagajanju okolju. To je ustrezno, če živali, kljub različnim vplivom okolja (kletka, hlev, pašnik), ne prekoračijo praga vzdrževanja zdravega stanja organizma s koordiniranimi fiziološkimi procesi, pri katerih sodelujejo vsi organi in tudi sposobnost organizma, da nadzira svoje notranje okolje ob vplivih zunanjega okolja. Z drugimi besedami – žival je prizadeta, kadar normalni regulacijski mehanizmi telesa ne zadoščajo več za obvladovanje okolja ali dogajanj v okolju. Slednje nezmožnosti lahko vodijo v spremenjeno počutje živali, poslabšanje zdravja, slabši izkoristek krme, sposobnost razmnoževanja in v skrajnih primerih tudi smrt. Glavna izhodišča za ocenjevanje dobrega počutja po drugem konceptu so: meritve obnašanja in fizioloških procesov, ocenjevanje zdravja živali, poškodb, motenj v rasti, razvoju in razmnoževanja.

Tretji koncept temelji na ocenjevanju čustvovanja živali. Dobro počutje živali je ustrezno, če so živali zadovoljene in ne prikazujejo čustev trpljenja, strahu, bolečine, lakote, žeje, temveč vse oblike obnašanja, ki izražajo zadovoljstvo. Primarni cilj koncepta je torej v zbiranju informacij o tem, kaj žival čuti.

Pri ocenjevanju dobrega počutja se morajo uporabiti vsi koncepti, saj se med seboj povezujejo in dopolnjujejo. Kako ugotoviti, kdaj je živalim zagotovljeno dobro počutje? To je naslednji problem, s katerim se ukvarjajo številni raziskovalci. Bistvena težava je v raznolikosti vrst in načinov obnašanja posameznih vrst živali. Človek na primer lahko pove in se izrazi o občutjih, obenem so občutki med nami primerljivi, pri živalih različnih vrst pa je oboje težavno. Največji napredek na tem področju je vse večja razpoznavnost komunikacije med živalmi. Za ugotavljanje občutij in subjektivnih odločitev je še vedno najustreznejši preferenčni test. Toda tudi tu se srečujemo s težavami, saj bi bilo za te teste smotno uporabljati le živali s podobnimi izkušnjami, da se le-te lahko odločajo med velikim številom različnih ponujenih možnosti. Pomembno je ločiti tudi izbiro, ki bo koristna na dolgi ali le na kratki rok (primer prenašanja, izbira napačne vrste hrane). Drugi testi so namenjeni predvsem ugotavljanju negativnih izkušenj, ki jih živali pridobe zaradi bolečine, strahu in drugih stresnih dejavnikov. Tu je še radiotelemetrija, ki omogoča meritve stresa živali z merjenjem srčnega utripa in krvnega tlaka. V slini, urinu in blatu je kot merilo stresa mogoče določati glukokortikoide.

ZAGOTOVITEV TEMELJNIH CILJEV ZA ZAGOTOVITEV DOBREGA POČUTJA IN ZAŠČITE LABORATORIJSKIH ŽIVALI

Temeljni cilji za zagotovitev dobrega počutja in zaščite laboratorijskih živali so ustrezna uporaba in skrb za živali, humano ravnanje pri poskusih ter izobraževanje o osnovnih potrebah laboratorijskih živali. Priporočila Komiteja za institucionalno uporabo in skrb za živali (Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC) se nanašajo predvsem na:

- racionalno in namensko rabo živali v poskusih;
- upravičeno rabo določenega števila in vrst živali;
- dostopnost alternativnih metod ali ne-invazivnih metod pri poskusih in uporabo izoliranih tkiv in organov oziroma računalniških simulacij;
- izvajanje poskusov le z izobraženim in izkušenim osebjem;
- kakovostno namestitve poskusnih živali;
- uporabo ustrezne anestezije, analgezije in pomirjeval;
- izogibanje ponavljanja poskusov;
- ustrezno vodenje poskusov s kirurškimi postopki;

- vodenje kriterijev glede časa obremenjevanja živali v poskusih, prekinitve poskusov in evtanazije, kadar se ne da izogniti bolečim in stresnim poskusom;
- zdravljenje živali po poskusih;
- metode evtanazije;
- varnost osebja in okolja pri poskusih.

VLOGA OBOGATITVE OKOLJA PRI ZAGOTAVLJANJU DOBREGA POČUTJA ŽIVALI

Živali, ki služijo človeku za številne namene, bivajo v okoljih, ki morajo zadoščati minimalnim pogojem, utemeljenim na podlagi raziskav glede osnovnih zahtev živali. Ti upoštevajo predvsem prostor, klimatske pogoje, prehrano, opremljenost in osnovne higienske pogoje, ki živalim omogočajo predvsem dobro telesno počutje. To je velikokrat premalo, da bi se živalim poleg telesnega dobrega počutja zadostilo tudi glede psihološkega in čustvenega dobrega počutja in bi bivale v okolju, ki bi jim olajšalo prilagajanje ter bivanje v siromašnih okoljih in omogočalo naravne oblike obnašanja. Iz tega razloga je mogoče bivalno okolje živali tudi ustrezno obogatiti. Najpogosteje uporabljene obogatitve okolja so usmerjene v:

- različnost elementov okolja in prehrane,
- elemente obogatitev v prostoru,
- družabnost in socialne interakcije,
- nudenje nadzora nad prostorom,
- izbiro in
- nepredvidljivost.

Obogatitve nedvomno prispevajo k zadovoljevanju čustvenih in psihičnih potreb živali, kar vodi v dobro počutje, normalno obnašanje in zdravje ter v razvoj, prirast in pravilne odzive laboratorijskih živali v poskusih.

LITERATURA

1. Brambell Committee. Report of the technical committee to require into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. London: HM Stationery Office, 1965.
2. Broom DM. Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. *Acta Agric Scand Sec A Anim Sci* 1996; 27 (Suppl): 22–8.
3. Corrado C, Verga M. Animal welfare: review of the scientific concept and definition. *Ital J Anim Sci* 2009; 8 (Suppl. 1): 21–30.
4. Duncan, I. J. H. Animal welfare defined in terms of feelings. *Acta Agric Scand Sec A Anim Sci* 1996; 27 (Suppl.): 29–35.
5. Fraser AF, Broom DM. Farm animal behaviour and welfare. London: Balliere Tindall, 1990.
6. Kos U. Škode in obnašanje govedi v počivališču po dolgotrajnih cestnih transportih: magistrsko delo = Losses and behaviour of cattle in lairage facilities after long-distance road transport: thesis. Ljubljana: Veterinarska fakulteta UL, 2001.
7. Kos U. Preference psov za različne obogatitve okolja v zavetišču: doktorska disertacija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta UL, 2005.
8. Štuhec I, Jordan D, Zupan M. Prevod besedne zveze animal welfare v slovenski jezik ne bi smel biti problem. *Acta Agric Slov* 2011; 98 (2): 167–70.

UVOD

Izraz evtanazija oz. humani način usmrtitve se nanaša na pospešitev smrti brez bolečine oz. minimalno bolečino in stisko živali. Beseda evtanazija izhaja iz grških besed *eu* in *thantos* in pomeni »dobro smrt«.

Osnovni kriteriji za humani način usmrtitve z vidika skrbi za dobro počutje živali vključujejo hitro izgubo zavesti, minimalno stisko ter ireverzibilno in zanesljivo depresijo centralnega živčnega sistema, ki ima za posledico smrt živali, v našem primeru poskusne živali. Pri izbrani metodi naj bo čim manj prijetanja in fiksacije živali. Metoda mora biti primerna starosti in vrsti živali, ne sme povzročati strahu in stresa. Mora biti zanesljiva in nepovratna ter enostavna za izvedbo. Potrebno je zagotoviti, da živali povzroči najmanjšo možno vznemirjanje, bolečino in trpljenje.

Kriteriji, ki se nanašajo na izvajalca evtanazije, so estetski vidik evtanazije in varnost za osebo, ki vrši postopek. Pomembno je pomisliti na kompleksnost protokola in strošek izvedbe ter ju načrtovati. Posebno dobro je potrebno načrtovati način evtanazije pri poskusnih živalih, katerih organi se bodo nadalje uporabljali v raziskavi za npr. histo(pato)loške ali farmakološke raziskave.

Za izvajanje evtanazije je pomembno, da je osebje, ki jo izvaja, sposobno prepoznati znake bolečine, strahu in stiske, ki so značilni za določeno vrsto živali. Ocena teh znakov je primarno osnovana na opazovanju nenaravnega obnašanja in fizioloških odzivov, ki odražajo stisko in strah. Odvisno od vrste lahko ti znaki vključujejo značilne zvoke oz. oglašanje, upiranje prijemu, poskuse pobega, obrambno agresivnost, negibnost oz. otrplost, slinjenje, globoko dihanje, uriniranje, defekacijo in praznjenje analnih vrečk, razširjenost zenic, tahikardijo, potenje, refleksno krčenje skeletne mišičnine, ki se odražajo kot tresenje, drgetanje ali mišični krči.

Nekateri izmed teh znakov se lahko pojavljajo pri zavestnih in nezavestnih živalih. Strah lahko pri nekaterih vrstah, še posebej kuncih, povzroči negibnost. Te negibnosti ne smemo interpretirati kot nezavest, ker je žival dejansko pri polni zavesti.

Oglašanje živali, ki odraža stisko (tudi zvoki, ki jih ljudje ne moremo zaznati), prestrašeno obnašanje in sproščanje nekaterih vonjav in feromonov lahko povzročijo strah tudi pri drugih živalih. Zato je pomembno, da druge živali niso prisotne pri evtanaziji (še posebej, če se oglašanje ali sproščanje feromonov dogaja v času indukcije nezavesti) in zadnji dve živali v skupini, če je možno, evtanaziramo skupaj. Evtanazijo izvajamo v posebnem prostoru.

Osebe, ki jim je opravljanje evtanazije dovoljeno, morajo imeti primerno izobrazbo in biti ustrezno usposobljene. Usposabljanje osebe, ki vrši evtanazijo, mora poleg seznanitve z načinom izvajanja obsegati posamezne metode, tudi prepoznavo in potrditev nastopa smrti. Najpomembnejši znaki smrti so prenehanje srčnega utripa in dihanja, odsotnost refleksov, pri majhnih laboratorijskih glodavcih tudi padec telesne temperature pod 25 °C in mrtvaška odrevenelost (*rigor mortis*). V kolikor obstaja kakršenkoli dvom o nastopu smrti, je treba uporabiti še drugo metodo usmrtitve.

Oprema, instrumenti in napeljave, ki se uporabljajo za usmrtitev živali, morajo biti načrtovani in vzdrževani na način, ki zagotavlja izpolnjevanje zahtev za izvedbo evtanazije. Vsi morajo biti redno pregledovani, čiščeni in po potrebi servisirani.

METODE EVTANAZIJE

Za evtanazijo poskusnih živali se uporabljajo različni sprejemljivi načini usmrčitve, ki jih v grobem razdelimo na fizikalne ter farmakološke metode. Dovoljeni načini so predpisani s Pravilnikom o načinih usmrčitve poskusnih živali (Ur. l. 140/2006).

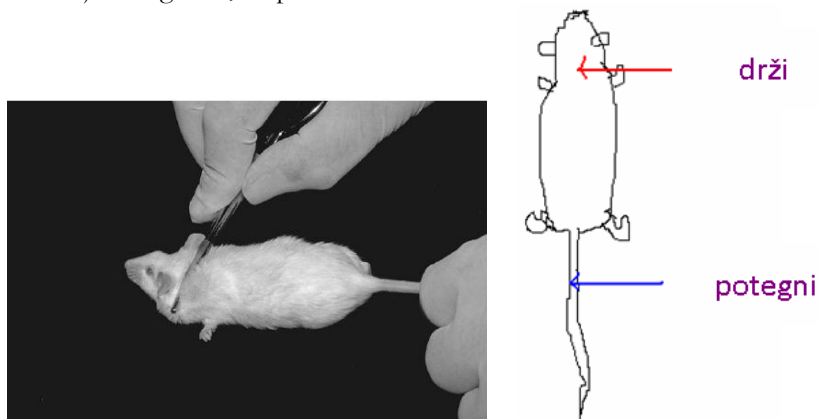
Pri farmakoloških metodah gre za administracijo prekomernega odmerka splošnega anestetika pri predhodno sediranih živalih. To je relativno hitra metoda, sprejemljiva tudi z estetskega vidika, medtem ko fizikalne metode preprečujejo t. i. farmakološko kontaminacijo živali. Ta metoda je primernejša v primeru, da bodo organi ali deli organov uporabljeni za nadaljnje poskuse, predvsem izolacijo celic ali farmakološke poskuse.

Načini usmrčitve so odvisni od vrste, starosti, teže živali ter namena usmrčitve. Živali se ob zaključku poskusa usmrtilo zaradi sekcije in zbiranja materiala za nadaljnje preiskave, zaradi bolezni oz. poškodb, ki povzročajo trpljenje živali, pridobivanja organov, tkiv in celic ter kot presežne živali v vzrejnih ustanovah (živali, ki niso primerne za nadaljnji razplod, oz. nadštevilne živali, ki npr. niso primerne tipa oz. spola glede na potrebe).

FIZIKALNE METODE

Uporabimo jih predvsem takrat, ko načrtujemo farmakološko ali histološko analizo vzorcev.

1. **Dislokacija vratnih vretenc (cervikalna dislokacija)** se uporablja za usmrnitev rib, perutnine, miši, mladih morskih prašičkov in podgan, katerih teža ne presega 150 g ter novorojenih kuncev, mačk in psov. Uporabi se lahko tudi pri starejših podganah in kuncih, katerih telesna teža ne presega 1 kg in so pred izvedbo dislokacije v nezvesti. Dislokacijo (nateg in rotacijo vratu) lahko izvaja le oseba, ki je za to dobro usposobljena. Pri tej metodi pride do poškodbe hrbtenjače in s tem prekinitve povezave med možgani in vitalnimi organi. Dislokaciji vratu sledi še druga metoda usmrčitve, npr. izkrvavitev ali uničenje možganov, da potrdimo smrt.



Slika 1. Prikaz cervikalne dislokacije pri miši.

2. **Obglavljenje** se uporablja za usmrnitev rib, dvoživk, glodavcev in majhnih kuncev. Pri obglavljenju z ostrim rezilom prerežemo vrat v neposredni bližini glave. Uporabljajo se t. i. giljotine in škarje z zelo dolgimi in primernimi rezili.

3. **Strel v glavo** zagotavlja takojšnje uničenje možganov in je učinkovita metoda za usmrnitev velikih plazilcev in sesalcev. Obstajata dve možnosti, prosti strel in strel s penetrirajočim klinom. Izstreljek mora prodreti v možgansko skorjo. Takšnemu načinu usmrčitve mora slediti takojšnja izkrvavitev.

4. Pri manjših živalih, kot so npr. majhni kunci, novorojene mačke in psi, podgane, miši, mladi morski prašički, hrčki, ptice, majhni plazilci, dvoživke in ribe lahko uporabimo **udarec v zatilje** kot metodo, s katero povzročimo trenutno nezavest. Tudi tej metodi sledi izkrvavitev, odstranitev srca ali možganov, pri dvoživkah in plazilcih pa kontuzija možganov. Metodo lahko izvaja le posebej usposobljeno osebe. Ker je pravilno izvajanje te metode težko zagotoviti, se ta metoda izvaja le izjemoma in za manjše število živali.

5. **Udar z električnim tokom** se uporablja za usmrnitev rib, dvoživk, ptic, psov in drugih mesojedov, ovc, telet, koz in kuncev. Izvaja se z napravo, ki je namenjena izključno tej metodi usmrtnitve. Znaki uspešnega udara z električnim tokom so iztegnjene okončine, opistotonus (ukrivljenost telesa in krč okončin), rotacija očesnih zrkel navzdol in tonični krč, ki preide v kloničnega z mlahavostjo mišic. Po 15 do 20 sekundah se lahko refleksi ponovijo, zato je potrebno izvesti še drugo metodo usmrtnitve, npr. izkrvavitev.

Obstajajo pa tudi drugi načini, kjer uporabimo metodo takojšnje zamrznitve s pomočjo tekočega dušika, metodo radiacije z mikrovalovi, uporabljajo pa se predvsem pri zarodkih in neonatalnih glodavcih in kuncih.

FARMAKOLOŠKE METODE

Številni anestetiki se v prekomernih odmerkih, vsaj trikratnem odmerku, uporabljajo kot sredstva za evtanazijo, saj s tem povzročimo zastoj srca, čemur sledi smrt. Uporabiti se smejo le registrirani splošni anestetiki ob pogoju, da so živali predhodno sedirane.

1. Inhalacijska sredstva

Inhalacijska sredstva se uparjajo ali pretvarjajo v plinsko obliko v posebnih komorah ali anestezijskih sistemih. Uporabljajo se predvsem pri manjših živalih. Pri dvoživkah in plazilcih moramo upoštevati, da lahko za nekaj časa zadržijo dih, zato je potreben daljši čas indukcije. Novorojene živali so bolj odporne na hipoksijo in je za nastop smrti potreben daljši čas, zato je priporočljivo izbrati drugo metodo usmrtnitve.

Oglikov dioksid (CO_2) v koncentracijah nad 60 odstotki deluje kot anestetik in povzroči hitro izgubo zavesti. Za usmrnitev večine malih živali ga lahko uporabimo v koncentraciji nad 70 odstotki, da živali izgubijo zavest, nato pa postopoma zvišujemo koncentracijo do pogina živali. *Post mortem* lahko opazimo spremembe v pljučih živali.

Oglikov monoksid (CO) povzroči hitro smrt zaradi hipoksije. Ni primerna metoda za plazilce zaradi njihove visoke tolerance za hipoksijo, sprejemljiva pa je za male živali. Smrt potrdimo z uporabo fizikalne metode.

Hlapni inhalacijski anestetiki se lahko uporabljajo le v posebnih sistemih, ker je potrebno v fazi indukcije zagotoviti zadostno količino kisika ali zraka, da se prepreči hipoksija in tudi zmanjša tveganje za zdravje ljudi. Uporabljajo se halotan, enfluran in isofluran. Za ribe se uporabljajo sredstva, ki se absorbirajo preko kože in škrg.

Benzokain (*etil amino benzoat*) najprej raztopimo v acetonu, nato ga dodamo vodi v akvariju. Uporablja se kot sredstvo za evtanazijo rib in dvoživk. Razpolovna doba je 4 ure, kar pomeni, da je benzokain varen za okolje in osebe. Za zanesljivo usmrnitev uporabimo še fizikalno metodo usmrtnitve.

Trikain metan sulfonat (*puferiran MS-222*) je zanesljiva metoda usmrtnitve rib in dvoživk. Topen je v slani in sladki vodi. Učinkovitost je odvisna od vrste in velikosti živali ter temperature in trdote vode.

Etra naj ne bi uporabljali, ker povzroči ekscitacijo in iritacijo mukoznih membran.

2. Injekcijska sredstva

Pri večjih živalih izberemo intravenozno pot, pri manjših vrstah pa intraperitonealni ali intrakardialni način. Pri ribah in dvoživkah jih raztopimo v vodi, v katero damo žival.

Barbiturati so najpogostejše uporabljeni. Natrijev pentobarbiton velja za najbolj primerne. Uporablja se ga intravenozno ali intraperitonealno v 18-odstotni koncentraciji in odmerku 200 mg/kg. Izguba zavesti je hitra, prav tako zaviranje dihanja. Značilna za to vrsto načina evtanazije živali je velika vranica, ki jo opazimo *post mortem*, zato tega načina ne uporabimo, če jo ocenjujemo.

T-61 je komercialna mešanica lokalnega anestetika, hipnotika ter mišičnega relaksanta, ki jo apliciramo počasi, intravenozno. Žival mora biti predhodno sedirana. Pri tej metodi pri večjih živalih ne vidimo terminalne zadihanosti kot v primeru barbituratov, vidimo pa trzanje mišic in stokanje živali, ki sta značilna za začetno fazo anestezije in ne za zadušitev živali.

Obstajajo številne komercialne mešanice, ki so pripravljene za evtanazijo. Mnoge so enostavno mešanice anestetikov v trikratnem odmerku, npr. natrijev pentobarbiton, v druge so lahko dodani živčno-mišični blokatorji. Kadar uporabljamo sredstva z dodanimi živčno-mišičnimi blokatorji, moramo živali predhodno obvezno popolnoma anestezirati.

Edino sredstvo, ki se uporablja samo v namene evtanazije, je kalijev klorid (KCl). Aplikacija je boleča, zato ga smemo uporabiti samo v primeru, da je žival v splošni anesteziji. Je močno kardiotoksičen, zato intravenozna ter intrakardialna aplikacija povzroči odpoved srca. *Post mortem* lahko opazimo tudi povečane notranje organe, predvsem vranico.

Glede pravilnega odmerka in načina vnosa se moramo vedno ravnati po navodilih proizvajalca. Najpogostejše se sredstva aplicirajo intravenozno, ker je učinek tako najhitrejši in najbolj zanesljiv.

Preglednica 1. Nekatere metode evtanazije.

Metoda	Živalska vrsta	Mesto delovanja	Varnost	Aplikacija
Halotan	Glodavci, mačke, pasji mladiči, majhne ptice	Neposredna inaktivacija korteksa, subkorteksa, življenjskih centrov v podaljšani hrbtenjači	Kronična inhalacija je lahko škodljiva	Enostavno z anestezijskim aparatom
CO₂	Glodavci, mačke, pasji mladiči, majhne ptice	Neposredna inaktivacija korteksa, subkorteksa, življenjskih centrov v podaljšani hrbtenjači in depresija miokarda	Minimalna nevarnost	Zaprta škatla
Barbiturati	Vse živali	Neposredna inaktivacija korteksa, subkorteksa, življenjskih centrov v podaljšani hrbtenjači	Varno	Intravenozno
Cervikalna dislokacija	Laboratorijske živali do teže 200 g	Neposredna inaktivacija možganov	Varno	Potrebna je usposobljenost osebja
Obglavljenje	Glodavci in mladi kuni	Neposredna inaktivacija možganov	Nevarnost mehanične poškodbe	Enostavno, usposabljanje je minimalno
T61	Psi, mačke, laboratorijske živali, ptice	Anestezija, nezavest, relaksacija mišic	Varno pri umirjenih živalih	Intravenozno, drugače lahko nastopijo komplikacije

Kadavri se odstranjujejo v skladu z veljavno zakonodajo (glej poglavje o ravnanju s kadavri in živalskimi stranskimi proizvodi). V zvezi z usmrtnitvijo pa je potrebno voditi predpisane evidence: evidence o usmrtnitvi, shranjevanju živalskih trupel in oddaji živalskih trupel (za nadaljnje informacije glej poglavje o evidencah).

ZAKLJUČEK

Naloga raziskovalca je, da izbere primerno metodo usmrtnitve, ki ustreza vrsti živali in ni v nasprotju z znanstvenimi cilji projekta, še posebej če je potrebno zbiranje organov ali tkiv. Izbrana metoda mora biti sprejemljiva za osebje, ki jo izvaja. Pomembna je tudi primerna usposobljenost izvajalcev za različne vrste usmrtnitve.

LITERATURA

1. Close B, Banister K, Baumans V, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. DGXI of the European Commission. Lab Anim 1996; 30: 293–316.
2. Close B, Banister K, Baumans V, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. DGXT of the European Commission. Lab Anim 1997; 31: 1–32.
3. van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. 2nd rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.
4. Pravilnik o načinih usmrtnitve poskusnih živali. Ur List RS 2006; 16(140): 16316.

UVOD

Predpogoj za uspešno raziskovalno delo v laboratorijih za poskusne živali so kontrolirane reje; poznano poreklo in zdravstveni status poskusnih živali. Najpogostejše vrste živali, ki se uporabljajo v bioloških poskusih v Sloveniji, pripadajo redu glodavcev – *Rodentia*, takoj za njimi najdemo kunce – *Oryctolagus cuniculus*.

Najpogostejše vrste glodavcev, ki se uporabljajo v poskusih:

- laboratorijske miši (*Mus musculus*)
- podgane (*Rattus norvegicus*)
- hrčki (*Mesocricetus auratus*, *Cricetulus griseus*, *Cricetulus migratorius*, *Cricetus cricetus*,
Phodopus campbelli, *Phodopus sungorus*)
- budre ali morski prašički (*Cavia porcellus*)
- gerbili ali puščavski skakači (*Meriones unguiculatus*, *Meriones* sp.)
- čincile (*Chinchilla laniger*)

Kontrola zdravstvenega statusa poskusnih živali ne obsega samo laboratorijskih pregledov živali na določene kužne bolezni, ampak tudi kontrolo nad organskimi, presnovnimi in drugimi nekužnimi boleznimi, redne klinične preglede živali, kontrolo krme, nastila in mikroklima, vsakodnevna opazovanja skrbnikov in vodenje skrbnih zapiskov o poteku dogajanj, tudi tistih, ki niso povezana s samim poskusom, ter ne nazadnje redne konzultacije med skrbniki, raziskovalci, ki delajo s poskusnimi živalmi, in veterinarji, ki kontrolirajo zdravstveno stanje reje. Ne smemo pozabiti na redne preglede poginjenih živali, tudi kontrolo pogina v gnezdih, še posebej če pride do povečane moralnosti v določenem obdobju. Kadar je potrebno, se izvajajo tudi redne kontrole za določene kužne bolezni pri oskrbnikih oziroma osebju, ki so v stiku s poskusnimi živalmi (salmonele, dermatomikoze, endoparaziti ipd.). Nič manj ni pomembna kontrola oziroma obveza oskrbovalcev, da doma nimajo hišnih ljubljencev iste vrste, s katerimi delajo poslovno. Prav tako je pomembno, da ne obiskujejo farm ali niso v kakršnihkoli stikih z drugimi glodavci in kuncmi. Zdravstveni monitoring je torej integriran del kakovostnega sistema, tj. dobre laboratorijske prakse, akreditacije in ISO standardov.

V rejah z laboratorijskimi živalmi, kot so glodavci in kunce, lahko pride do okužb, ki pa niso vedno klinično vidne, ampak so lahko tudi latentne. Slednje lahko pomembno vplivajo na rezultate bioloških eksperimentov, zato sta dobro počutje živali in redna kontrola zdravstvenega stanja toliko bolj pomembna. Nekatere izmed okužb glodavcev in kuncev so tudi pomembne zoonoze. Glavne virusne, bakterijske, glivične in parazitarne okužbe so podane v preglednicah 1, 2, 3 in 4 (zoonoze so pisane poudarjeno). Preglednice so povzete po priporočilih FELASA (Federation of European laboratory animal science associations). Priporočajo se testiranja na vsake 3 mesece oziroma enkrat letno.

Preglednica 1: Nekatere pogostejše virusne bolezni glodavcev in kuncev v rejah poskusnih živali (povzročitelji zoonoz so pisani poudarjeno).

*	VIRUSNE OKUŽBE
<u>M</u> , <u>P</u>	Adenovirus pri miših in podganah (K87 in FL)
B	Adenovirus pri budrah
K	Calicivirus pri kuncih (virus hemoragične bolezni kuncev)
M	Coronavirus pri miših (virus mišjega hepatitisa)
P	Coronavirus pri podganah (virusni sialodacryoadenitis)
	Coronavirus pri kuncih (kunčji črevesni corona virus)
<u>M</u>	Cytomegalovirus pri miših
<u>B</u>	Cytomegalovirus pri budrah
<u>P</u>	Hantavirusi predvsem pri podganah
<u>M</u> , H	Limfocitni horiomeningitis virus (pri miših in hrčkih)
M	Parvovirusi pri miših (mišji minutni virus in mišji parvovirus)
P	Parvovirusi pri podganah (Kilham-ov podganji virus in podganji parvovirus)
P	Parvovirus pri hrčkih in podganah (Toolan H-1 virus)
	Parvovirus pri kuncih
M	Picornaviridae (Theiler-jev mišji encefalomyelitis virus) pri miših
M, P	Pnevmovirus (mišji virus pnevmonije, pnevmoviruse najdemo tudi pri podganah, budrah in hrčkih)
<u>M</u>	Pox virus pri miših (Ectomelia virus)
	Pox virus pri kuncih (Myxoma virus)
<u>M</u> , <u>P</u>	Reovirus (tip 3) pri miših, podganah, budrah in hrčkih
M	Rotavirus pri miših (epizootska driska novoskotnih miši)
K	Rotavirus pri kuncih
M, P, B, H	Sendai virus (pri miših, podganah, budrah in hrčkih)

* Priporočila FELASA o minimalnih testiranjih na kužne bolezni v rejah po posameznih živalskih vrstah (M – miši, P – podgane, B – budre (morski prašički), H – hrčki, K – kunci). Vrste laboratorijskih živali, kjer se priporočajo testiranja le enkrat letno, so podčrtane.

Preglednica 2: Nekatere pogostejše bakterijske bolezni glodavcev in kuncev v rejah poskusnih živali (povzročitelji zoonoz so pisani poudarjeno).

	BAKTERIJSKE OKUŽBE
	<i>Actinomyces pyogenes</i> pri budrah
P, B, K	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (podgane, budre, kuncí)
	<i>Brucella spp.</i> pri budrah
	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> pri hrčkih
	<i>Chlamydia muridarum</i> pri miših in hrčkih
B	<i>Chlamydomphila caviae</i> pri budrah
M	<i>Citrobacter rodentium</i> pri miših
	<i>Citrobacter freundii</i> pri budrah
M, P, B, H, K	<i>Clostridium spp.</i> (<i>C. piliforme</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. spiroforme</i>)
	<i>Corynebacterium bovis</i> pri golih miših
	<i>Corynebacterium bovis</i> pri golih miših
	<i>Corynebacterium kutscheri</i> pri miših in podganah, budrah, hrčkih
M, P, B, H	<i>Corynebacterium paulometabulum</i> pri hrčkih
	okužbe z rikecijami pri miših, podganah in budrah
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> pri budrah
	<i>Escherichia coli</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Helicobacter spp.</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Haemophilus sp.</i> pri budrah
M, P, H	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pri miših
	<i>Lawsonia intracellularis</i> pri hrčkih
	<i>Leptospira spp.</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Lysteria monocytogenes</i> pri budrah
	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> in
	<i>M. leprae-murinum</i> pri miših
M, P	<i>Mycoplasma spp.</i> (<i>M. pulmonis</i>) pri miših in podganah
M, P, B, H, K	<i>Pasteurellaceae</i> (<i>P. pneumotropica</i> in <i>P. multocida</i>) pri glodavcih in kuncih
	<i>Proteus mirabilis</i> pri miših
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Salmonella spp.</i> pri glodavcih in kuncih
M, P, B, H, K	<i>Staphylococcus aureus</i> pri glodavcih in kuncih
M, P, B	<i>Streptobacillus moniliformis</i> (pogosto skupaj s <i>Spirillum minus</i>) pri miših podganah in budrah
M, P, B, K	<i>Streptococcus spp.</i> (<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>) pri glodavcih in kuncih
K	<i>Treponema paraluís cuniculi</i> pri kuncih
B	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> pri budrah

* Priporočila FELASA o minimalnih testiranjih na kužne bolezni v rejah po posameznih živalskih vrstah (M – miši, P – podgane, B – budre (morski prašički), H – hrčki, K – kuncí). Vrste laboratorijskih živali, kjer se priporočajo testiranja le enkrat letno, so podčrtane.

Preglednica 3: Nekatere pogostejše glivične in protozoarne bolezni glodavcev in kuncev v rejah poskusnih živali (povzročitelji zoonoz so pisani poudarjeno).

	GLIVIČNE OKUŽBE
	<i>Aspergillus</i> sp. pri podganah in kuncih
	<i>Microsporum</i> sp. pri budrah in kuncih
B, K	<i>Trichophyton</i> sp. pri budrah in kuncih
B, K	<i>Pneumocystis carinii</i> pri miših in podganah
	PROTOZOARNE OKUŽBE
M, P, B, H, K (po izbiri)	<i>Balantidium</i> sp. pri budrah
	<i>Coccidia</i> (<i>Eimeria</i> sp., <i>Klossiella</i> sp.) pri kuncih, budrah, miših in podganah
	<i>Cryptosporidium</i> sp. (<i>C. muris</i> , <i>C. parvum</i>) pri miših, budrah in kuncih
B, H, K	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> pri kuncih in budrah, tudi druge vrste glodavcev
	<i>Entamoeba</i> sp. pri glodavcih in kuncih
	<i>Giardia muris</i> pri glodavcih
	<i>Hexamita</i> sp. pri hrčkih
	<i>Spironucleus</i> sp. pri miših, podganah in hrčkih
	<i>Toxoplasma gondii</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Tritrichomonas muris</i> pri miših in hrčkih

* Priporočila FELASA o minimalnih testiranjih na kužne bolezni v rejah po posameznih živalskih vrstah (M – miši, P – podgane, B – budre (morski prašički), H – hrčki, K – kunci). Vrste laboratorijskih živali, kjer se priporočajo testiranja le enkrat letno, so podčrtane.

Preglednica 4: Nekatere pogostejše parazitarne bolezni glodavcev in kuncev v rejah poskusnih živali (povzročitelji zoonoz so pisani poudarjeno).

	INVAZIJE Z ENDOPARAZITI
M, P, B, H, K (po izbiri)	cestodi (<i>Hymenolepis nana</i>) pri glodavcih
	nematodi (<i>Aspicularis</i> sp., <i>Syphacia obvelata</i> , <i>Trichosomoides crassicauda</i> , <i>Paraspirodera uncinata</i>) pri glodavcih in kuncih
	trematodi pri glodavcih
	Pentastomes (<i>Linguatula serrata</i>) pri budrah
	INFESTACIJE Z EKTOPARAZITI (garje, tekuti, uši, bolhe)
M, P, B, H, K (po izbiri)	<i>Cheyletiella parasitivorax</i> pri kuncih
	<i>Chirodiscoides caviae</i> pri budrah
	<i>Demodex</i> sp. pri hrčkih
	<i>Gliricola porcelli</i> pri budrah
	<i>Listrophorus gibbus</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Myocoptes musculus</i> pri miših
	<i>Myobia musculi</i> pri miših
	<i>Notoedres cati</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Psoroptes cuniculi</i> pri kuncih
	<i>Radfordia</i> sp. pri miših in podganah
	<i>Sarcoptes scabiei</i> pri glodavcih in kuncih
	<i>Tryxacarus caviae</i> pri budrah

* Priporočila FELASA o minimalnih testiranjih na kužne bolezni v rejah po posameznih živalskih vrstah (M – miši, P – podgane, B – budre (morski prašički), H – hrčki, K – kunci). Vrste laboratorijskih živali, kjer se priporočajo testiranja le enkrat letno, so podčrtane.

Poudarimo naj, da je shema zdravstvenega monitoringa običajno prilagojena lokalnim potrebam posameznih laboratorijev in ni vedno potrebno testirati na vse povzročitelje, le načrt monitoringa mora biti vedno jasno opredeljen in vnaprej določen. Obstaja tudi različno tveganje pojava okužb v razmnoževalnih enotah in eksperimentalnih enotah, zato načrt zdravstvenega monitoringa prilagodimo tudi temu. Po priporočilih FELASA se na primer miši lahko testira na 26 različnih povzročiteljev; 18 od teh štirikrat letno in ostale enkrat letno.

Nekatere bakterijske, predvsem pa virusne okužbe so v rejah z laboratorijskimi živalmi izredno redke, vendar pa se zaradi imunske supresije, ki jo povzročajo, visoke obolevnosti in smrtnosti ter potencialne nevarnosti za ljudi (npr: okužba s citomegalovirusi ali poxvirusi, okužba s hantavirusi, ki je pri podganah inaparentna, invazija z nematodi vrste *Syphacia obvelata*) priporoča testiranje tudi na te okužbe.

Poleg kužnih bolezni lahko večje zdravstvene probleme v rejah povzročajo tudi problemi, vezani na organske, presnovne in druge nekužne bolezni: slaba odlakanost, problemi z zobmi (malokluzije), motnje v obnašanju živali, kanibalizem. Pogosto se v rejah srečujemo tudi z genetskimi problemi, ki so največkrat posledica nekontroliranega parjenja v sorodu in potenciranja dednih napak, kot so zgodnje zamiranje embriov in posledično majhna legla, slabša odlakanost ali popolna alopecija, povečana občutljivost na pogojno patogene mikroorganizme ipd.

Pogostost vzorčenja in velikost vzorca

Kot so lahko različne izbire testiranja na posamezne bolezni pri različnih živalskih vrstah, je različna tudi odločitev o pogostosti testiranja in velikosti vzorca. Kljub temu so glede tega podana osnovna priporočila. Znotraj reje FELASA priporoča testiranja na vsake 3 mesece. Potrebno je testirati vsako posamezno živalsko vrsto posebej, vzorec pa je odvisen od velikosti reje. Redno je potrebno opravljati tudi patoanatomske preiskave poginulih živali. V priporočilih je podana formula za potrebno število pregledanih živali na rejo. Velja pravilo, da je potrebno pregledati 10 laboratorijskih miši v reji 100 živali, v kolikor je pričakovana prevalenca 30-odstotna in želimo imeti 95-odstotno stopnjo zaupanja. V primerih velikega tveganja (če imamo živali za različne eksperimente, če imamo pogoste vnose novih živali v rejo ali različne gojitelje za isto ali različne vrste živali) se priporoča mesečno testiranje 3 do 5 živali v reji. Obvezno moramo vključiti tudi karanteno, kar pomeni, da moramo imeti za to ločene prostore, kjer jo lahko izvedemo.

Ob nabavi novih živali se priporoča osamitev živali (interna karantena), ki naj ne bi bila krajša od 5 do 6 tednov, zaradi povprečne dolžine inkubacije (14 dni) in tvorbe specifičnih protiteles proti posameznim okužbam, ki potrebujejo še dodatnih 14 dni. Testiranja se opravijo 4 tedne po pričetku karantene. Strokovnjak lahko dolžino interne karantene ustrezno skrajša, vsekakor pa naj karantena traja vsaj 21 dni oziroma do pridobitve rezultatov vseh potrebnih in zahtevanih preiskav.

Najpogostejše ugotovljeni zdravstveni problemi

Večino opisanih zdravstvenih problemov sledimo v rejah glodavcev in kuncev v Sloveniji, ne pa tudi v rejah poskusnih živali, kjer je trenutno zdravstveno stanje zelo ugodno. Zaradi možnosti prenosa okužb je pomembna tudi epizootiološka slika stanja v drugih rejah glodavcev in kuncev. Še posebej to velja za virusne bolezni, kot so hemoragična bolezen kuncev in miksomatoza, kjer naj bi se redno izvajala tudi preventivna cepljenja. Prav iz tega pogleda je pomembna tudi kontrola vnosa krme in nastila, kontrola učinkovitosti dezbarier in možnosti vstopa nepooblaščenim osebam, redno izvajanje DDD v okolici laboratorijev za poskuse ter ne nazadnje tudi kontrola prisotnosti drugih vrst živali pri oskrbnikih in drugih zaposlenih.

Po naših izkušnjah v rejah glodavcev in kuncev najpogostejše ugotavljamo prebavne težave (klostridijske okužbe, okužbe z *E. coli*, kokcidioza) in dihalna obolenja (pastereloza, stafilokokoza). Kožne dermatomikoze so precej pogoste in potencialno nevarne ljudem. Sem sodita predvsem trihofitoza (*Trichophyton mentagrophytes*) in mikrosporija (*Mycrosporium* sp.).

Med ektoparaziti je pri laboratorijskih miših treba poudariti *Myocoptes musculus* in *Myobia muscili*, pri budrah *Tryxacus caviae* (potencialna zoonoza), ušesno garjavost pri kuncih, ki jo povzroča *Psoroptes cuniculi*, hejletieloza pri kuncih, ki jo povzroča *Cheyletiella parasitivorax* (potencialna zoonoza), in demodikozo pri hrčkih. Pri budrah najpogosteje sledimo tekute vrste *Gliricola porvelli*. Le-ti ne povzročajo resnejših zdravstvenih problemov, lahko pa so prenašalci virusnih, bakterijskih in glivičnih okužb, zato jih moramo v reji redno tretirati. Enako velja tudi za druge ektoparazite.

Na osnovi Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS, št. 88/2006) je obvezno testiranje glodavcev na prisotnost virusa *Orthopox* – osepnice opic (Monkeypox virus). V laboratorij se pošilja vzorec krvi v epruvetah z EDTA, kjer se izvaja metoda PCR.

Po tem pravilniku morajo vzrejne organizacije zagotavljati redno kontrolo zdravstvenega stanja živali v skladu z zakonom, ki ureja veterinarstvo. Živali morajo proste naslednjih bolezni:

- laboratorijski glodavci (miši, podgane, morski prašički, hrčki) osepnic opic;
- psi stekline;
- mačke stekline in TSE;
- ptice aviarnе influence, atipične kokoške kuge in psitakoze;
- primati razen človeka ebole in osepnic opic.

Vzrejne organizacije morajo po tem pravilniku glede kontrole zdravstvenega stanja živali imeti letni načrt nadziranja živalskih bolezni, vključno z ustrežno kontrolo zoonoz, in ga do konca septembra za naslednje leto predložiti VURS-u v odobritev.

Prav tako morajo vzrejne organizacije imeti zagotovljeno klinično, laboratorijsko in patomorfološko testiranje živali, za katere se sumi, da so okužene z nalezljivo boleznijo, opravljena preventivna cepljenja in diagnostične preiskave v skladu s predpisanimi preventivnimi ukrepi. Vzrejna organizacija mora pristojnemu upravnemu organu nemudoma prijaviti vsak sumljivi primer pogina ali suma bolezni iz drugega odstavka druge priloge tega pravilnika. Za glodavce in kunce so to osepnice opic.

Med zoonozami, ki smo jih v preteklih letih diagnosticirali pri glodavcih in kuncih, so bile poleg prej omenjenih dermatomikoz in ektoparazitov še salmoneloza pri različnih vrstah glodavcev, listerioza (*Lysteria monocytogenes*) pri činčilah, infestacije s *Cryptosporidium parvum* pri miših, infestacija s *Hymenolepis nana* pri hrčkih in miših ter okužba z bakterijo *Chlamydothila caviae* pri budrah.

Pri kuncih naj poudarimo hemoragično bolezen kuncev in miksomatozo, ki se v Sloveniji redno pojavljata in povzročata veliko ekonomsko škodo. Živali v večjih rejah so cepljene proti tema virusnima obolenjema in nekatere tudi proti trihofitozi.

Nekužne bolezni so v rejah za laboratorijske živali po današnjih rezultatih pogostejše. Najpogosteje ugotavljamo kanibalizem, probleme v reprodukciji, slabo odlakanost (predvsem pri miših), probleme z zobmi, bolezen prstanastih repov (ring tail disease) pri podganah, petne žulje, etopatije, razne dedne napake in ne nazadnje tumorje različne etologije. Med kužnimi boleznimi najpogosteje sledimo ekto- in endoparazitozo, infekcijo z *E. coli*, klostridiji, pastrelami, bordetelami, stafilokoki ter druge dihalne, prebavne in kožne infekcije.

ZAKLJUČEK

Za najpogostejše bolezni, ki se pojavljajo v rejah poskusnih živali, bodo na predavanjih podane lastnosti povzročitelja, patogeneza, patologija, klinična slika, način odvzema vzorcev, diagnostika, terapija in patoanatomska slika pri posameznih vrstah glodavcev in kuncih. Prikazane so predvsem dosedanje izkušnje na tem področju dela v Sloveniji, hkrati pa so prikazane tudi manj pogoste, a nevarne kužne bolezni, na katere moramo biti pozorni tudi s stališča prenosa na ljudi – zoonoze (citomegalovirusne okužbe, trihofitoza) ali kužne bolezni, ki povzročajo velike ekonomske izgube in pogine v rejah (hemoragična bolezen kuncev, miksomatoza).

Osnovni biološki parametri in najpogostejši zdravstveni problemi miši, podgan, morskih prašičkov – buder, hrčkov, gerbilov, južnoameriških činčil in kuncev so podani v omenjenih literaturnih podatkih, celoten pregled kužnih bolezni za laboratorijske živali pa lahko dobite v knjigi *Laboratory animal medicine*.

LITERATURA

1. Bradley TA. What every veterinarian needs to know about rabbits. *Exotic DVM* 2001; 3(1): 42–6.
2. Flecknell PA. *BSAVA manual of rabbit medicine and surgery*. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 2000.
3. Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW. *Laboratory animal medicine*. 2nd ed. London: Academic Press, 2002.
4. Fudge A. M. *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.
5. Leck S, Johnson - Delaney C. What every veterinarian needs to know about gerbils. *Exotic DVM* 2004; 6(5): 36–40.
6. Leck S. Chinchillas: what every veterinarian needs to know. *Exotic DVM* 1998; 1(1): 30–1.
7. Leck S. Rats: what every veterinarian needs to know. *Exotic DVM* 1999; 1(5): 42–4.
8. Leck S. What every veterinarian needs to know about hamsters. *Exotic DVM* 2000; 2(5): 38–41.
9. Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002; 36(1): 20–42.
10. Nicklas W, Homberger FR, Illgen – Wilcke B, et al. Implications of infectious agents on results of animal experiments. *Lab Anims* 1999; 33(1): 39–87.
11. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. *Ur List RS* 2006; 16(88), *Ur List RS* 2009; 19(81).
12. Direktiva 2010/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2010 o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene. *Ur List EU* 2010; L 276: 33–76.

UVOD

Kljub velikemu prizadevanju medicinske in veterinarske stroke, da bi se poskusi na živalih popolnoma opustili in nadomestili s poskusi *in vitro*, je pri določenih preiskavah del diagnostičnih postopkov še vedno potrebno opraviti na poskusnih živalih. Na splošno se sme biološki poskus izvajati le v primeru, ko ni na voljo nobenega alternativnega načina testiranja. Vsak poskus mora biti izveden tako, da živalim povzroči minimalno možno neugodje oz. trpljenje in je hkrati varen za osebe, ki tak poskus izvaja. Laboratorijske živali so namreč v času reje in poskusov v zelo velikem stresu, zato lahko reagirajo zelo nepredvidljivo oz. postanejo bolj dovzetne za različne kužne in druge bolezni. Zaradi tega se lahko poveča možnost poškodb, s tem pa tudi prenos nekaterih kužnih bolezni z živali na rejce oz. laboratorijsko osebo. Posebno nevarni so povzročitelji zoonoz (kužne bolezni, ki se v naravnih okoliščinah lahko prenašajo z živali na ljudi). Nevarni pa so lahko tudi mikroorganizmi, ki so sicer patogeni predvsem za živali, vendar se lahko prek poškodbe (ugriza, praske) prenesejo tudi na ljudi. Za zdravje ljudi so lahko nevarne tudi živali, ki sicer ne kažejo znakov bolezni, vendar so lahko prenašalke mikroorganizmov, ki lahko povzročajo bolezni pri ljudeh. Posebno nevarnost lahko pomenijo za ljudi z oslajeno imunsko sposobnostjo, zato delo z laboratorijskimi živalmi za tako osebo pomeni preveliko tveganje. Laboratorijske živali morajo biti zdrave tudi zaradi svojega dobrega počutja, nekatere pa morajo biti proste specifičnih mikroorganizmov (specific pathogen free, SPF), ki bi lahko vplivali na izvedbo poskusov.

KAJ SO ZOONOZE?

Zoonoze so bolezni, ki se po naravni poti prenašajo med živalmi in ljudmi. Nekateri povzročitelji teh bolezni so pri živalih prisotni v prikriti obliki, pri prenosu na ljudi pa lahko privedejo do različnih hudih obolenj in izjemoma celo do smrti.

Vse običajne vrste laboratorijskih živali so nosilci različnih mikroorganizmov na koži, dlaki, ustni votlini in ostalih delih prebavnega kanala, dihalnih organih, urogenitalnem sistemu in seču. Večina teh mikroorganizmov je popolnoma neškodljivih, nekateri pa se obnašajo kot oportunisti in povzročajo bolezni samo pod posebnimi pogoji (npr. zmanjšana odpornost gostitelja, aplikacija neposredno na sluznice ali poškodovano kožo, zaužitje večje količine kužnine ipd.). Nekateri mikroorganizmi lahko na živalih tudi mutirajo in povzročijo hujšo obliko bolezni, kot je običajno.

Na splošno velja, da je potrebno vse živali obravnavati kot potencialni vir okužbe, vendar je pogosto večja verjetnost prenosa bolezni s tistih živali, ki so ljudem filogenetsko bolj sorodne.

Kunci in različni mali glodavci (miške, podgane, budre, hrčki, skakači) so zaradi svoje velikosti in nezahtevnosti razmeroma pogoste laboratorijske živali. Ob pravilni in ustrezni negi so precej zdrave, poleg tega pa praviloma tudi manj ogrožajo zdravje skrbnikov kot druge domače živali, npr. psi in mačke. Kljub temu pa so občutljive za nekatere bakterijske, virusne in glivične bolezni, med katerimi so nekatere tudi zoonoze.

Teoretično bi v skupino zoonoz, za katere so dovzetne številne živalske vrste, sodile steklina, salmoneloza, kampilobakterioza, tularemija in leptospiroza, vendar je zaradi strogega nadzora nad njihovim pojavljanjem majhna verjetnost, da bi ogrožale zdravje ljudi. Pomembne zoonoze so dermatofitoze, ki so v Sloveniji močno razširjene pri številnih živalskih vrstah in (po nam dostopnih podatkih) predstavljajo tveganje za okužbo skrbnikov živali in drugih laboratorijskih delavcev.

Kampilobakterioza

Najpogostejši povzročitelj je *Campylobacter jejuni*, manj pomembna pa sta *C. fetus* subsp. *fetus* in *C. fetus* subsp. *intestinalis*. Naravni gostitelji so perutnina, primati, psi, mačke, prašiči (*C. coli*) in druge domače živali. Pri živalih navadno ni vidnih znakov okužbe, lahko pa se bolezen izrazi ob stresu ali slabih pogojih reje. Običajno se pojavi akutna ali izjemoma kronična driska, ki je lahko vodena, krvava ali mukoidna. Opazna je neješčnost, povišana telesna temperatura, lahko pa tudi bruhanje. Pogosto premine brez zdravljenja. Najpomembnejši način prenosa je z izločki bolnih živali, lahko pa tudi z zauživanjem kontaminiranih živalskih proizvodov, čeprav poskusnih živali v nobenem primeru ne smemo uporabljati za prehrano ljudi.

Nevarnost za zdravje ljudi. Inkubacijska doba je 2–10 dni. Okuženi ljudje čutijo bolečine v prebavilih in imajo drisko, ki navadno traja 3–5 dni, povišana pa je tudi telesna temperatura. Zdravljenje običajno ni potrebno, vendar lahko z antibiotiki zelo zmanjšamo prenos bolezni. Tveganje za okužbo je majhno, pri živalih, kjer sumimo na možnost okužbe, pa odvezujemo rektalne brise ali blato za bakteriološko preiskavo.

Salmoneloza

Povzročitelji so bakterije iz rodu *Salmonella*, predvsem *S. typhimurium* in *S. enteritidis*. Večja nevarnost okužb je pri pticah in plazilcih, lahko pa tudi pri primatih, psih in glodavcih.

Nevarnost za zdravje ljudi. Živali in ljudje so navadno nosilci salmonel, občasno pa jih lahko tudi izločajo in zbolijo z bolj ali manj blagimi prebavnimi motnjami. Redkeje pride do sistemskih obolenj, kot so endokarditis, meningitis, artritis ipd.

Način prenosa. Večinoma z izločki okuženih živali, tveganje za okužbo pa je zelo majhno.

Tularemija

Povzročitelj je bakterija *Francisella tularensis*, naravni gostitelji pa so domači in divji sesalci, ptice, kunci in glodavci (veverice, voluharji, podgane).

Bolezen pri živalih. Klinični znaki pri živalih so nespecifični. V začetku so otrple in zaspane, neješče, imajo vročino. V septikemični fazi bolezni so močno dehidrirane in navadno poginejo.

Način prenosa. Zelo pogosto se bakterija prenaša s piki insektov (klopi, obadi in drugi krvosesi insekti), ali ob stiku s kontaminiranimi živalskimi proizvodi. Možen je tudi prenos z aerosolom ali z ugrizi okuženih živali. Bakterija lahko prodre v organizem tudi prek poškodovane ali izjemoma celo prek intaktne kože.

Nevarnost za zdravje ljudi. Inkubacijska doba pri ljudeh je običajno 3–5 dni. Pojavijo se vročina, glavobol, slabost, neješčnost in utrujenost, lahko pa tudi bruhanje, bolečine v mišicah, trebušni krči in driska. Manj virulentni sevi lahko povzročijo blage znake bolezni, ki je praviloma samoozdravljiva. Zelo znana pa je tudi ulceroglandularna oblika, pri kateri je značilna razjeda na mestu pika oz. okužbe, hkrati pa otečejo pripadajoče bezgavke. Taka oblika je redko smrtna in se običajno uspešno pozdravi z antibiotiki. Tveganje za okužbo je zelo majhno.

Leptospiroza

Povzročajo jo bakterije iz rodu *Leptospira*, v katerega je uvrščenih več patogenih in nepatogenih vrst. Za okužbo so dovzetne številne domače živali in ljudje, izvor in rezervoar okužbe pa so glodavci. Bolezen se prenaša neposredno ali posredno z živali na ljudi in sodi med poklicne bolezni veterinarjev, kmetov in drugih rejcev živali. Bakterije dolgo perzistirajo v ledvičnih tubulih in se izločajo z urinom. V telo vdrejo prek kože ali očesnih veznic. Sledi diseminacija po celem telesu, pojavijo se visoka vročina, bolečine v mišicah, toksični šok, lahko pa tudi meningitis. Zaradi imunskega odgovora sledi druga faza s sistemskimi simptomi (meningitis, prizadetost oči, ikterus), v krvi se pojavijo protitelesa (IgM), leptospire pa se izločajo z urinom. Pestrost kliničnih znakov otežuje diagnozo, vendar je stik z glodavci pomemben anamnestični podatek.

Kunci in glodavci lahko prenašajo praktično vse povzročitelje bolezni, ki smo jih omenili v prejšnjem poglavju. Poleg tega pa so nosilci številnih bakterij, ki so zanje patogene, v primeru poškodb (ugrizov, prask) pa so izjemoma patogene tudi za ljudi, ki delajo z njimi.

Okužbe s pasterelami

Najpogostejša kužna bolezen kuncev je **pastereloza**, ki jo povzroča bakterija *Pasteurella multocida* (*P. multocida*). Bolezen se prenaša s kronično okuženimi živalmi z neposrednim ali posrednim stikom. *P. multocida* je pogosto prisotna na sluznici nosa, sapnika in konjunktiv, lahko pa je razširjena povsod po telesu. Pastereloza se lahko kaže v več oblikah. Najpogostejša je respiratorna oblika s pljučnico in vnetjem nosnih prehodov in sinusov. Ker kunci dihamo skozi nos, pomeni obstrukcija nosnih prehodov izjemno težko klinično stanje. Okužbe, ki niso pravočasno in ustrezno zdravljene, so za žival lahko usodne. V sklopu respiratornih obolenj ali kot samostojna bolezen se lahko pojavi tudi konjunktivitis ali vnetje srednjega ušesa.

Nevarnost za zdravje ljudi. Bolne živali navadno ne pomenijo večje nevarnosti za zdravje skrbnikov, razen če pride do ugrizov ali prask, pri čemer se povzročitelj zanese neposredno v poškodovano tkivo. Tedaj se pri ljudeh lahko razvijejo abscesi, okužba pa se lahko razširi tudi v globlja tkiva. Za okužbo so bolj dovzetni ljudje z zmanjšano imunsko sposobnostjo.

Okužbe s stafilokoki in streptokoki

Pri kuncih se zelo pogosto pojavljajo abscesi, ki jih povzroča predvsem *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), lahko pa tudi *P. multocida* in redkeje druge gnojne bakterije. Abscesi so lahko posamezni ali pa številčni in se lahko pojavijo na več delih telesa. Bolezen je pomembna, ker se okužba lahko razvije tudi na notranjih organih, zobnih koreninah in kosteh. Gnoj je lahko zrnat ali mazav kot zobna krema. Stafilokoki so lahko normalno prisotni na koži in sluznicah, zaradi različnih vzrokov pa lahko povzročajo lokalna ali sistemska obolenja.

Nevarnost za zdravje ljudi. Možnost prenosa stafilokokov z živali na ljudi je možna, vendar navadno v podobnih okoliščinah kot pri pasterelah. Nevarnost za zdravje ljudi se poveča, če gre za seve *S. aureus*, ki so bolj odporni proti antibiotikom.

Glodavci so dovzetni za okužbe s streptokoki, ki lahko povzročajo različna gnojna in/ali septična stanja. Med njimi so nekateri nevarni tudi za zdravje ljudi, predvsem *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mitis* ipd.

Okužbe z listerijami

Med sistemskimi obolenji je zelo pomembna listerioza, ki jo povzroča bakterija *Listeria monocytogenes*. Listerioza je posebno pomembna, ker spada med resne zoonoze in zato bolezen prijavljamo po zakonu. *L. monocytogenes* je po Gramu pozitivna palička, ki jo lahko najdemo povsod v naravi in je izjemno odporna proti različnim vplivom okolja. Posebno dovzetne so činčile, zbolijo pa lahko tudi vse ostale vrste glodavcev in kuncev. Listerioza je bila prvič opisana ravno pri kuncih in glodavcih (gerbili). Bolezen najpogosteje ugotovimo šele po smrti živali, ko opazimo drobne bele spremembe na notranjih organih, predvsem jetrih. Pri činčilah povzročajo tudi resne reprodukcijske probleme. Poleg okužb z *L. monocytogenes* so pri činčilah opisane tudi okužbe z *L. ivanovi*.

Nevarnost za zdravje ljudi. Ljudje se lahko z *L. monocytogenes* okužujejo neposredno od bolnih živali, predvsem kadar bolezen poteka v taki obliki, da so prisotni izločki iz naravnih telesnih odprtih (npr. pri abortusu ali vnetju maternice). Večji problem pa lahko nastane, kadar ob neupoštevanju higienskih norm pride do kontaminacije hrane (kjer se listerije lahko naglo razmnožujejo tudi pri nizkih temperaturah) in posredne okužbe ljudi. Posebno rizična skupina so nosečnice, pri katerih lahko pride do abortusa, vendar pa nosečnice tudi zaradi drugih razlogov praviloma niso primerne za oskrbovalce laboratorijskih živali.

Čeprav se živali lahko okužujejo tudi z drugimi listerijami (izjemoma z *L. ivanovi*), v literaturi ni podatkov, da bi predstavljale večjo nevarnost za zdravje ljudi.

Bolezni prebavnega trakta

Poleg specifičnih povzročiteljev lahko črevesna obolenja povzročajo tudi nekatere bakterije, ki jih običajno izoliramo pri drugih domačih živalih, lahko pa se okužijo in zbolijo tudi laboratorijske živali. Povzročitelji so predvsem iz rodov *Salmonella* in *Escherichia*. Živali so sicer lahko neposredni prenašalci

bolezni, s svojimi izločki pa lahko tudi močno kontaminirajo okolje in tako posredno vplivajo na zdravje ljudi.

Glivične okužbe

Med glivičnimi obolenji predstavljajo problem le dermatofitoze, ki jih pri živalih povzročajo plesni iz rodov *Trichophyton* in *Microsporum*. Najpogostejši povzročitelj pri laboratorijskih živalih pri nas je *T. mentagrophytes*, lahko pa tudi *T. verrucosum* in *T. erinacei*, pri mesojedih živalih pa predvsem *M. canis* in *M. gypsum*.

Naravni gostitelji so lahko praktično vse vrste laboratorijskih živali. Okužbe se lahko kažejo z značilnimi kliničnimi znaki, predvsem z izpadanjem dlake in različnimi spremembami na koži. **Način prenosa.** Živali so lahko le asimptomatski prenašalci bolezni (predvsem odrasle mačke in kunci) in pomenijo stalen vir okužbe za druge živali in ljudi. Bolezen se prenaša z neposrednim stikom z okuženimi živalmi, lahko pa tudi prek okužene dlake in pribora za nego živali (krtače).

Nevarnost za zdravje ljudi. Inkubacijska doba je običajno 2–3 tedne, spremembe pa se pojavijo predvsem na izpostavljeni koži, lahko pa tudi na lasišču in nohtih. Na površini kože se najprej pojavi drobna rdeča pika ali madež, ki se širi v obliki kroga. Sprememba je lahko rahlo pordela ali prhljajasta, rob pa je rahlo zažarjen. Kadar gre za močno okužbo so spremembe lahko številne in se prekrivajo. Okužba lasišča se kaže v obliki večjih ali manjših brezdlčnih mest, kjer po uspešnem zdravljenju dlaka ponovno zraste.

Tveganje za okužbo je zelo veliko. Ker so trihofitoze v Sloveniji na splošno precej razširjene, smo že imeli primere bolezni tudi med laboratorijskimi živalmi (predvsem kunci), ki so postale vir okužbe za njihove oskrbovalce in laboratorijske delavce. V vseh primerih je bil povzročitelj *Trichophyton mentagrophytes*. Povzročitelje dokažemo z mikroskopsko in gojiščno preiskavo.



Generalizirana oblika trihofitoze pri laboratorijskem kuncu



Trihofitoza na koži roke pri veterinarskem delavcu

Slika 1: Primer okužbe z dermatofitom *Trichophyton mentagrophytes* v reji laboratorijskih živali.

BOLEZNI PERUTNINE

Ptice so zaradi svojih anatomskih in fizioloških značilnosti redkeje uporabljene za biološke poskuse, vendar lahko na ljudi prenašajo različne povzročitelje kužnih bolezni. Poleg črevesnih bolezni (npr. salmoneloza) so med bolj pomembnimi klamidioza, histoplazmoza, kriptokokoza in tuberkuloza. Povzročitelji se lahko prenašajo inhalacijsko, prek izločkov in poškodb.

Kriptokokoza je glivična bolezen, ki jo povzroča kvasovka *Cryptococcus neoformans*. Naravni gostitelji so predvsem golobi, pri katerih je normalno prisotna v blatu in ne povzroča nobenih kliničnih težav. V posušeni izločki živali se kvasovka lahko namnoži in se s prahom dviga v zrak.

Nevarnost za zdravje ljudi. Ljudje in druge živali se večinoma okužijo inhalacijsko, zbolijo pa z različnimi bolezenskimi znaki. Pojavijo se lahko različne respiratorne težave, težja oblika bolezni pa je

meningitis, ki se lahko konča tudi s smrtjo. Redkeje se pojavi lokalizirana kriptokokoza v obliki kožnih abscesov.

Tveganje za okužbo je zmerno. Kvasovka je v Sloveniji prisotna, zato bi bilo v primeru uporabe golobov za biološki poskus smiselno pregledati vsaj skupinski vzorec blata.

DIAGNOSTIKA POVZROČITELJEV ZOONOZ

Živali, ki se uporabljajo za laboratorijske namene, so pogosto že v osnovi gojene oz. rejene za ta namen in so praviloma zdrave oz. vakcinirane proti različnim boleznim, ki se obravnavajo kot zoonoze. Kljub temu pa je v takih rejah potrebno redno preverjati njihovo zdravje oz. odsotnost bolezni, ki bi lahko motile biološki poskus ali pa ogrožale zdravje ljudi, ki delajo z njimi.

Material

Pri kuncih so za bakteriološko preiskavo najpogostejše primerni brisi kože in sluznic (očesnih, nosnih), različni organi poginjenih živali (predvsem pljuča, jetra, ledvice) in iztrebki. Za mikološko preiskavo so primerni predvsem dlaka in kožni ostružki, redkeje pa brisi kože in sluznic. Pri poskusnih živalih najpogostejše pregledujemo vzorce farmskih kuncev za okužbe s pasterelami in stafilokoki ter trihofitozo, vzorce činčil pa za trihofitozo in listeriozo. Za diagnostiko virusnih bolezni najpogostejše vzamemo vzorec krvi za različne serološke preiskave.

NEVARNOST OKUŽBE OB APLIKACIJI PREISKOVANEGA BIOLOŠKEGA MATERIALA IN KUŽNIN

Veliko bolj nevarna kot naravna okužba laboratorijskih živali pa je aplikacija različnega biološkega materiala, kužnin in kultur mikroorganizmov ali njihovih produktov (npr. toksinov) med samimi diagnostičnimi postopki. Število postopkov, kjer je še vedno potreben biološki poskus, se na srečo vedno bolj zmanjšuje, vendar pa je pri nekaterih boleznih **izjemoma** še nujen in edini možen za postavitev zanesljive končne diagnoze. Pri nas se biološki poskus izvaja izjemoma (kadar ni možnosti za testiranje *in vitro*) pri diagnostiki antraksa, botulizma, tetanusa in za dokazovanje nekaterih drugih bakterijskih toksinov (npr. toksinov školjk). Pri tem gre za aplikacijo preiskovanega materiala dovzetnim živalim (navadno miškam).

Pri aplikaciji je potrebno izjemno paziti, da ne pride do okužbe izvajalca (z vbodom, aerosolom itd.). Pomembno je tudi, da so živali med trajanjem poskusa ustrezno nastanjene oz. izolirane od ostalega laboratorijskega okolja, da je onemogočen prenos infekta. Poskus mora biti končan v najkrajšem možnem času in z minimalnim številom živali, ki še omogoča pravilno in zanesljivo izvedbo postopka. Po končanem poskusu je potrebno živali neboleče uspavati, ne glede na rezultat biološkega poskusa. Prostor in opremo je potrebno ustrezno razkužiti ter opraviti kontrolo po razkuževanju. Če obstaja najmanjši sum, da bi med izvedbo poskusa prišlo do okužbe osebja, je take delavce potrebno nemudoma napotiti k zdravniku. V takem primeru je nujno potrebno priložiti vse podatke o vrsti inokuluma in opisati okoliščine nesreče.

LITERATURA

1. Boro BR, Sarmah AK, Goswami JN, Chakrabarty AK. A case of abortion in rabbit due to *Aspergillus fumigatus* infection. Vet Rec 1978; 103 (13): 287–8.
2. Donnelly TM, Schaeffer DO. Disease problems of guinea pigs and chinchillas. In: Hillyer EV, Queseberry KQ, eds. Ferrets, rabbits, and rodents, clinical medicine and surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1997: 270–81.
3. Dovč A, Zdovc I, Jagličič - Korpič N. Listeriosis in chinchillas (*Chinchilla laniger*): biological experiment. In: Proceedings of ISOPOL XIV. Mannheim: Universitätsklinikum, Institut für Med Mikrobiologie und Hygiene, 2001: 1.
4. Geffray L. Infections associated with pets. Rev Med Intern 1999; 20 (10): 888–901.

5. Hebert GA, Crowder CG, Hancock GA, Jarvis WR, Thornsberry C. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family Micrococcaceae. J Clin Microbiol 1998; 26: 1939–49.
6. Kaliste E, Linnainmaa M, Meklin T, Nevalainen A. Airborne contaminants in conventional laboratory rabbit room. Lab Anim 2002; 36 (1): 43–50.
7. Kraft I. Diseases of chinchillas. Neptune City, NJ: TFH Publications, 1987.
8. Mičunović J, Bole - Hribovšek V, Juntos P, Pirš T, Dovč A. An outbreak of salmonellosis (*Salmonella typhimurium*) in chinchilla farm. In: Zbornik povzetkov I. Slovensko-hrvaškega simpozija o eksotičnih in divjih živalih. Zagreb: Hrvatsko veterinarsko društvo, 2004: 35–8.
9. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Mosby Year Book, 1994: 237–41.
10. Zdovc I, Dovč A, Jagličič - Korpič N. Animal listeriosis: an old or a current veterinary problem? In: Croatian and Slovenian symposium on microbiology and infectious diseases »Zoonoses today and tomorrow«: abstracts. Plitvička jezera, 2001. Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2001: 102.
11. Zdovc I, Mehle J. Current situation of animal listeriosis in Slovenia. In: Proceedings of ISOPOL XIV. Mannheim: Universitätsklinikum, Institut für Med Mikrobiologie und Hygiene, 2001: 93.
12. Zdovc I, Dovč A, Jagličič - Korpič N. *Trichophyton mentagrophytes* as a causing agent of dermatophytosis in chinchillas. In: Croatian and Slovenian symposium on microbiology and infectious diseases »Zoonoses today and tomorrow«: abstracts. Plitvička jezera, 2001. Zagreb: Croatia Microbiology Society, 2001: 67.
13. Zdovc I, Bole - Hribovšek V. Bakterijske in glivične zoonoze, ki jih prenašajo hišni ljubljenci. In: 13. Simpozij o aktualnih boleznih malih živali: zbornik referatov. Poljče, 2000. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali; Veterinarska fakulteta, 2000: 70–3.

UVOD

Splošna načela anestezije laboratorijskih živali so enaka kot pri drugih domačih živalih. Žival pred vsako anestezijo stehtamo, temeljito pregledamo in določimo stopnjo anestetijskega tveganja. Na osnovi anestetijskega tveganja in načrtovanega posega izberemo ustrezno anestetijsko tehniko in odredimo raven monitoriranja med anestezijo.

Pri živalih z majhno telesno maso, kjer je razmerje med telesno površino in prostornino veliko, presnova pa intenzivna, moramo biti še posebej pozorni na ohranjanje fiziološke telesne temperature in normoglikemije med posegom in po njem. Izogibamo se nepotrebnemu britju večjih telesnih površin in razkuževanju z alkoholnimi razkužili, ki hitro hlapijo in dodatno ohlajujejo živali.

Laboratorijskih glodavcev (podgane, miši, hrčki in morski prašički) in kuncev ni potrebno postiti, ker pri njih ne pride do bruhanja med uvodom v anestezijo. Kuncev in morskih prašičkov ne postimo tudi zato, da ne pride do endotoksemije po posegu. Izjemoma jih postimo pred operacijami prebavil. Odrasle pse in mačke postimo največ do 12 ur pred posegom (pri psih je priporočljiv lahko prebavljiv obrok do 4 ure pred posegom, saj s tem zmanjšamo možnost ezofagealnega refluksa in posledično ezofagitisa in striktur požiralnika). Vodo imajo lahko na voljo do posega. Odrasle prašiče in ovce postimo do 12 ur pred posegom, vodo pa imajo na voljo do 2 uri pred posegom. Mladičev NE postimo!

Med anestezijo ne smemo pozabiti na ustrezno tekočinsko terapijo. Najpogosteje apliciramo izotonične kristaloide (Ringerjev laktat) v odmerku 10–20 ml/kg/h. Tekočino lahko dajemo intravensko (IV), intraosalno (IOS), intraperitonealno (IP) ali subkutano (SC), ogrete morajo biti na telesno temperaturo.

Standardni nadzor med anestezijo zajema (kolikor dopušča velikost živali, kirurški poseg in opremljenost prostora) spremljanje frekvence dihanja in oksigenacije živali, frekvence srca in periferne pulza, telesne temperature in arterijskega tlaka (neinvazivno, invazivno). Pri tem so nam v veliko pomoč naslednji monitorji: kapnometer (kapnograf), pulzni oksimeter, Dopplerjev merilec arterijskega tlaka ali oscilometrični monitorji za merjenje krvnega tlaka, EKG in ezofagealni ali rektalni termometer. Med anestezijo spremljamo številne reflekse (kornealni, palpebralni, refleks Ahilove tetive idr.), položaj očesnega bulbosa, razširjenost zenic in tonus skeletnih oziroma žvekalnih mišic, na osnovi katerih si pomagamo pri ocenjevanju globine anestezije.

LABORATORIJSKI GLODAVCI

Injekcijske anestetike apliciramo laboratorijskim glodavcem intramuskularno, intraperitonealno ali intravensko. Pri intramuskularnem dajanju v stegenske ali ledvene mišice moramo paziti, da ne apliciramo na eno mesto prevelike količine zdravila, še posebej, če je to dražeče (npr. ketamin, ki ima nizek pH), saj lahko pride do poškodbe tkiva (subklinično vnetje, ulceracija, nekroza in samopoškodovanje). Dražeča zdravila pred injiciranjem razredčimo z destilirano vodo ali s fiziološko raztopino. Intraperitonealno dajanje je enostavno, živali pa ne kažejo znakov bolečine tudi pri aplikaciji dražjih zdravil. Zdravila apliciramo v spodnji levi trebušni kvadrant z živaljo v hrbtnem položaju in glavo navzdol. Intravensko dajanje je nekoliko zahtevnejše zaradi majhnosti živali (lateralna repna vena pri miših in podganah). Pri anestetiziranih živalih prideta v poštev še dorzalna metatarzalna in sublingvalna vena (podgana, miš) oziroma lateralna vena safena pri morskem prašičku.

Za injekcijsko anestezijo uporabljamo kombinacije ketamina s fenotiazini, benzodiazepini ali agonisti adrenoceptorjev α_2 , ki jih injiciramo IM ali IP. Intraperitonealno apliciramo tudi barbiturat pentobarbital (preglednica 1). Prebujanje po injekcijski anesteziji je v glavnem počasno kljub uporabi specifičnih antagonistov. Z atipamezalom antagoniziramo učinke agonistov adrenoceptorjev α_2 (medetomidin, deksmedetomidin, ksilazin). Uporabimo enak volumski odmerek atipamezola (merjeno v ml) kot medetomidina, deksmedetomidina ali 2 % ksilazina, ki smo ga uporabili za anestezijo živali. Atipamezol apliciramo IM, IV, IP ali SC.

Pri podganah je učinkovanje ketamina odvisno od spola in starosti živali. Čas spanja se krajša z dozorevanjem podgan. Samice, starejše od treh tednov, spijo dlje kot samci, ki so dobili enak odmerek ketamina. Ketamin lahko pripomore k nastanku želodčnega ulkusa zaradi stresa izzvanega s fiksacijo podgan. Na učinkovanje anestetikov vpliva tudi sev podgan.

Inhalacijska anestezija (halotan, izofluran, sevofluran) je sorazmerno enostavna in varna, saj omogoča boljši nadzor nad globino in trajanjem anestezije v primerjavi z injekcijsko anestezijo. Uvod v anestezijo opravimo v indukcijskih komorah ali s pomočjo obrazne oziroma glavne maske, ki jo lahko izdelamo sami iz 20 ali 50 ml injekcijske brizge. Vrednosti minimalne alveolarne koncentracije (MAK) za različne hlapne anestetike pri podgani in miši so prikazane v preglednici 3.

Intubacija laboratorijskih glodavcev je zahtevna, vendar omogoča bistveno boljši nadzor nad živaljo in asistirano oziroma vodeno predihavanje. Podgano, hrčka in morskega prašička intubiramo z direktno vizualizacijo žrela s pomočjo posebej predelanega pediatričnega laringoskopa ali otoskopa. Intubacija morskih prašičkov ni vedno izvedljiva zaradi mesnatga jezika in navzgor obrnjenega epiglotisa. Kot tubus uporabimo intravenski kateter (14 do 20 G), ki ga povežemo z ustreznim anestezijskim dihalnim sistemom (Ayrejev sistem T in njegove modifikacije, miniaturni krožni dihalni sistem za laboratorijske glodavce).

Krioanestezija ali anestezija s podhladitvijo neonatalnih podgan in miši se ponekod še vedno uporablja za krajše posege (do 30 min) kljub neetičnosti in nehumanosti postopka. Do nekaj dni stare podgane in miši se podhladijo v ledeni kopeli na telesno temperaturo 4 do 5 °C, pri čemer se dihanje in frekvenca srca upočasnita do te mere, da nista več zaznavna. Pri neonatalnih podganah, ki so bile „anestezirane“ na ta način, so ugotovili spremenjeno morfologijo možganov in vedenje v odrasli dobi. Ta metoda ni sprejemljiva zaradi stresa in bolečin pri ohlajanju in ponovnem ogrevanju živali in je v nasprotju z veljavno zakonodajo o zaščiti živali. Na voljo je vrsta drugih ustreznih anestezijskih tehnik, ki živalim omogočijo bistveno manj stresen uvod v in prebujanje iz anestezije.

Lokalne anestetike (lidokain, bupivakain, levobupivakain) uporabljamo pri laboratorijskih glodavcih redko zaradi majhne telesne mase in nevarnosti predoziranja. Pred dajanjem moramo natančno izračunati odmerek lokalnega anestetika in ga po potrebi večkrat razredčiti.

Preglednica 1: Anestetiki in njihove kombinacije pri laboratorijskih glodavcih.

Zdravilo	Odmerek	Učinek	Anestezija (min.)	Spanje (min.)
Podgana				
Ketamin/acepromazin	K 75 mg/kg + A 2,5 mg/kg IP/IM	Plitva AN	20–30	120
Ketamin/midazolam	K 75 mg/kg + Mi 5 mg/kg IP/IM	Plitva AN	20–30	120
Ketamin/medetomidin*	K 60–75 mg/kg + M 0,5 mg/kg IP	Kirurška AN	20–30	120–240
Ketamin/ksilazin	K 75–100 mg/kg + X 5–10 mg/kg IP	Kirurška AN	20–30	120–240
Propofol	7,5–10 mg/kg IV	Kirurška AN	5	10
Pentobarbital	40–50 mg/kg IP	Plitva AN	15–60	120–240
Tiopental	30 mg/kg IV	Kirurška AN	10	15
Miš				
Ketamin/acepromazin	K 100 mg/kg + A 5 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	20–30	40–120
Ketamin/midazolam	K 100 mg/kg + Mi 5 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	20–30	60–120
Ketamin/medetomidin*	K 75 mg/kg + M 1 mg/kg IP	Kirurška AN	20–30	60–120
Ketamin/ksilazin	K 50–100 mg/kg + X 5–10 mg/kg IP	Kirurška AN	20–30	60–120
Propofol	12–26 mg/kg IV	Kirurška AN	5–10	10–15
Pentobarbital	40–50 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	20–40	120–180
Tiopental	30–40 mg/kg IV	Kirurška AN	5–10	10–15
Hrček				
Ketamin/acepromazin	K 150 mg/kg + A 5 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	45–120	75–80
Ketamin/diazepam	K 70 mg/kg + D 2 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	30–45	90–120
Ketamin/medetomidin*	K 100 mg/kg + M 0,25 mg/kg IP	Kirurška AN	60	NP
Ketamin/ksilazin	K 80 mg/kg + X 5 mg/kg IP/IM	Kirurška AN	30–60	90–150
Pentobarbital	50–90 mg/kg IP	Imobilizacija/AN	30–60	120–180
Morski prašiček				
Ketamin/diazepam	K 60–100 mg/kg + D 5 mg/kg IM	Imobilizacija/AN	30–45	90–120
Ketamin/medetomidin*	K 40 mg/kg + M 0,5 mg/kg IP	Kirurška AN	30–40	90–120

Ketamin/ksilazin	K 40 mg/kg + X 5 mg/kg IP	Kirurška AN	30	90–120
Pentobarbital	30–45 mg/kg IP	Kirurška AN	60–90	240– 300

Legenda: A – acepromazin, AN – anestezija, B – butorfanol, D – diazepam, K – ketamin, M – medetomidin, Mi – midazolam, NP – ni podatka, P – propofol, X – ksilazin

* Namesto medetomidina (Domitor[®] 1 mg/ml) lahko uporabimo enak volumski odmerek (v ml/kg telesne teže) deksmedetomidina (Dexdomitor[®] 0,5 mg/ml)

KUNCI

Kunce fiksiramo previdno, saj lahko pri premočnem pritiskanju živali ob podlago pride do zloma ali subluksacije ledvenega dela hrbtenice. Pri starejših kuncih je pogosta pastereloza, ki se rentgensko kaže kot konsolidacija pljučnega tkiva. Starejše samice večkrat zbolijo za adenokarcinomom maternice s pljučnimi metastazami. Zaradi naštetih patologij in težavnosti diagnostike z avskultacijo dihal, je priporočljivo slikanje prsnega koša pred anesteziranjem starejših kuncev.

Kunci tvorijo encim atropinazo, ki hitro inaktivira atropin. Zato pri njih uporabljamo atropin v nekajkrat večjih odmerkih kot pri drugih živalih (1–2 mg/kg), injiciranje pa ponavljamo na 10–15 minut. Namesto atropina lahko uporabimo glikopirilat (0,01–0,02 mg/kg). Novejše smernice za anestezijo živali pa tako ali tako ne odobravajo rutinske uporabe antiholinergikov v premedikaciji oziroma med anestezijo. Antiholinergike uporabljamo zgolj selektivno (npr. pri izraziti bradikardiji ali pri uporabi visokih odmerkov opioidov, ki povzročijo bradikardijo).

Injekcijski anestetiki in njihove kombinacije, ki se uporabljajo pri kuncih, podobno kot pri laboratorijskih glodavcih, so navedeni v preglednici 2. Zdravila injiciramo intramuskularno v stegenske ali ledvene mišice, za intravensko dajanje pa je najprimernejša lateralna ušesna vena (venska kanila 24 G). Pred kateterizacijo obrijemo dlako in namažemo kožo s kremo, ki vsebuje lokalni anestetik lidokain (Emla[®]) in delno desenzibilizira področje punkcije. Pri kateteriziranju lateralne ušesne vene moramo paziti, da je ne zamenjamo z arterijo, ki leži na centralnem delu uhlja (to lahko uporabimo za invazivno merjenje arterijskega tlaka ali za vzorčenje krvi za plinsko analizo). Kateteriziramo lahko tudi lateralno metatarzalno ali cefalično veno (predvsem za dajanje infuzijskih tekočin). Tekočine lahko dajemo tudi intraosalno (stegenica, golenica).

Endotrahealna intubacija pri kuncih je težavna zaradi ozkega in dolgega nazofarinksa, debelega, mesnatega jezika, dolgega mehkega neba, velikega epiglotisa in dolgih incizivov, ki ovirajo dostop v ustno votlino. Premer grla je manjši kot premer sapnika in omejuje velikost endotrahealnega tubusa. Intubacija je mogoča z direktno vizualizacijo žrela (laringoskop s pediatričnim nastavkom), sorazmerno enostavna pa je slepa intubacija z glavo v hiperekstenziji. V poštev pridejo tubusi brez mešička (navadni ali Cole tubusi) št. 2,5–4 (notranji premer ali i.d. iz angl. internal diameter 2,5–4 mm).

Pri kuncih uporabljamo podobne dihalne sisteme kot pri laboratorijskih glodavcih (Ayrejev T sistem in njegove modifikacije, krožni dihalni sistem s pediatričnimi cevmi za male živali). Vrednosti MAK za različne hlapne anestetike pri kuncih so navedene v preglednici 3.

Izguba kornealnega refleksa je pri kuncih znak nevarno globoke anestezije (v primerjavi s psom ali mačko, kjer prisotnost kornealnega refleksa pomeni preplitvo anestezijo oziroma prebujanje iz nje).

Preglednica 2: Anestetiki in njihove kombinacije pri kuncih.

Zdravilo	Odmerek	Učinek	Anestezija (min)	Spanje (min)
Ketamin/acepromazin	K 40 –50 mg/kg + A 0,5–1 mg/kg IM	Kirurška AN	20–30	60–90
Ketamin/midazolam	K 25 mg/kg + Mi 2 –5 mg/kg IM	Kirurška AN	20–30	60–90
Ketamin/medetomidin*	K 25 mg/kg + M 0,5 mg/kg IM	Kirurška AN	30–40	120–240
Ketamin/medetomidin*	K 15 mg/kg + M 0,25 mg/kg IM	Kirurška AN	20–30	NP
Ketamin/ksilazin	K 30–40 m/kg + X 3-5 mg/kg IM	Kirurška AN	25–40	60–120
Ketamin/ksilazin	K 10 mg/kg + X 3 mg/kg IV	Kirurška AN	20–30	60–90
Ketamin/ksilazin/ acepromazin	K 35 mg/kg + X 5 mg/kg + A 0,75 mg/kg IM	Kirurška AN	45–75	100–150
Ketamin/ksilazin/ butorfanol	K 35 mg/kg + X 5 mg/kg + B 0,1 mg/kg IM	Kirurška AN	60–90	120–180
Propofol**	10 mg/kg	Plitva AN	5–10	10–15
Medetomidin/propofol	M 0,35 mg/kg IM + P do 3 mg/kg IV	Kirurška AN	10	
Pentobarbital***	30–45 mg/kg IV	Plitva AN	20–30	60–120
Tiopental	15–30 mg/kg IV	Kirurška AN	5–10	10– 15

Legenda:

A – acepromazin, AN – anestezija, B – butorfanol, D – diazepam, K – ketamin, M – medetomidin, Mi – midazolam, P – propofol, X – ksilazin

* Namesto medetomidina (Domitor[®] 1 mg/ml) lahko uporabimo enak volumski odmerek (ml/kg telesne teže) deksmedetomidina (Dexdomitor[®] 0,5 mg/ml). Učinke obeh lahko antagoniziramo z atipamezolom enako kot pri laboratorijskih glodavcih.

** Propofol v odmerkih večjih od 15 mg/kg povzroči zavore dihanja, z manjšimi pa težko dosežemo kirurško anestezijo.

*** Pentobarbital se uporablja zelo redko, saj pogosto pride do zavore dihanja preden dosežemo kirurško anestezijo (visoka smrtnost).

ANESTEZIJSKE MEŠANICE ZA LABORATORIJSKE GLODAVCE IN KUNCE

Anestezija traja do 60 minut. Če poseg traja dlje, anestezijo podaljšamo s polovičnim odmerkom anestezijske mešanice.

1. kunec

5 ml ketamina (100 mg/ml)

2,5 ml ksilazina (20 mg/ml)

1 ml acepromazina (10 mg/ml)

Odmerek: 1 ml/kg IM

2. morski prašiček, podgana

5 ml ketamina (100 mg/ml)

2,5 ml ksilazina (20 mg/ml)

1 ml acepromazina (10 mg/ml)
1,5 ml sterilne vode

Odmerek: 1 ml/kg IP ali SC ali IM

3. miš

Razredči mešanico za morske prašičke in podgane s sterilno vodo v razmerju 1:1.

Odmerek: 0,1 ml/20–30 g IP

4. morski prašiček, podgana – mešanica za carski rez

3 ml ketamina (100 mg/ml)

0,15 ml ksilazina (20 mg/ml)

1,75 ml sterilne vode ali fiziološke raztopine

*Odmerek: 0,75 ml SC morski prašiček (odrasel) 0,5 ml
SC podgana (odrasla)*

5. hrček

Uporabi mešanico za podgane v odmerku 2 ml/kg IP ali SC

OVCE

Ovce običajno sediramo v hlevu in šele nato transportiramo v prostor za predoperacijsko pripravo. Ker so čredne živali, naj bodo do posega vhlevljene, če je le mogoče, skupaj z drugimi ovci, saj se na ta način izognemo dodatnemu stresu zaradi osamitve živali.

Za intravensko dajanje zdravil so primerne marginalna ušesna vena, vena cefalika, jugularna vena in vena safena. Infuzijske raztopine najpogosteje injiciramo v jugularno veno.

Številne manjše posege pri ovcah lahko opravimo s kombinacijo sedacije in regionalnih anestezijskih tehnik. Zdravila v glavnem injiciramo intravensko, saj so ovce mirne živali in vstavljanje intravenskih katetrov običajno ni težavno. Ovce sediramo z benzodiazepini (diazepam 1 mg/kg IV, midazolam 0,5–1 mg/kg IV ali IM), ki jih lahko kombiniramo z opioidi (butorfanol 0,1–0,2 mg/kg IV ali IM, buprenorfin 0,006–0,01 mg/kg IV ali IM). Agonisti adrenoceptorjev α_2 , aplicirani IM ali IV (ksilazin 0,02–0,2 mg/kg, medetomidin 0,01–0,025 mg/kg, detomidin 0,01–0,05 mg/kg, romifidin 0,02–0,05 mg/kg; intravensko injiciramo nižje odmerke), sicer dobro sedirajo ovce, vendar povzročijo hipoksijo, ki traja bistveno dlje kot sedacija (do nekaj ur pri večjih odmerkih). Najverjetnejši vzrok hipoksije je sprememba ventilacijsko/perfuzijskega razmerja zaradi segmentalne obstrukcije dihalnih poti, pljučnih atelektaz in vzpostavitve pretoka krvi skozi žilne povezave, ki so bile prej zaprte. V nekaterih primerih se stanje klinično manifestira kot pljučni edem.

Za uvod v anestezijo lahko uporabimo ketamin, propofol ali tiopental. Odmerek je odvisen od premedikacije: npr. pri premedikaciji z midazolamom 1 mg/kg IV in butorfanolom 0,1 mg/kg

IV potrebujemo za uvod v anestezijo 5–8 mg/kg tiopentala oziroma 2–4 mg/kg propofola. Anestezijo najlažje vzdržujemo z inhalacijskimi anestetiki (preglednica 3), kot nosilni plin pa uporabimo kisik ali mešanico kisika in zraka. Dušikovega oksidula ne uporabljamo, ker se akumulira v predželodcih in pospeši nastanek timpanije. Pri prej omenjeni premedikaciji potrebujemo za vzdrževanje anestezije z izofluranom 1–1,5 % EtIso (koncentracija izoflurana na koncu izdiha). Anestezijo lahko poglobimo s subanestetičnimi odmerki ketamina (0,1–1 mg/kg IV).

Ovce intubiramo z direktno vizualizacijo žrela s pomočjo laringoskopa z dolgim nastavkom z glavo in vratom v hiperekstenziji. Intubacijo otežuje sorazmerno majhen manevrski prostor, saj lahko gobec pri odrasli živali razpremo le za nekaj cm. Odrasle ovce intubiramo s tubusom št. 12 (i.d. ali notranji premer 12 mm), ki ga povežemo s krožnim dihalnim sistemom (pretok svežih plinov najmanj 20 ml/kg/min).

Med anestezijo se pri večini ovc razvije timpanija predželodcev, ki jo lahko le delno preprečimo z vstavitvijo gastrične sonde, prek katere se odvajajo plini. Če s sondo ne uspemo odstraniti plinov, stanje pa se slabša, trokiramo žival (primerni so venski katetri velikosti G 14 ali 16). Če je le mogoče, naj ovce med posegom ležijo na boku, saj v hrbtnem položaju pritisk trebušnih organov na trebušne vene zmanjša venski priliv in s tem minutni volumen srca. Po posegu ovce namestimo v sternalni položaj, ekstubiramo pa jih šele, ko prično žvečiti oziroma kašljati. Pazimo tudi, da ne aspirirajo regurgitirane vsebine predželodcev. Nekaj ur po posegu živali skrbno nadziramo, saj se pogosto razvije pooperacijska timpanija predželodcev. Pline odstranimo s stiskanjem trebuha (živali same podrignejo) ali s pomočjo gastrične sonde.

PRAŠIČI

Prašiči se zelo hitro razburijo in intenzivno vokalizirajo, kadar jih poskušamo fiksirati. Zato jih je najprimerneje sedirati pred kakršnimkoli posegom (npr. vstavljanjem intravenskega katetra). Sedative damo intramuskularno, pri čemer pazimo, da zdravilo injiciramo dovolj globoko, saj imajo odrasle živali nekaj cm maščobnega tkiva v podkožju. Kadar injiciramo večjo količino zdravila i.m., si pomagamo tako, da hipodermalno iglo povežemo z brizgo prek podaljška (npr. podaljšek s trosmernim ventilom) in živali med injiciranjem zdravila omogočimo prosto gibanje. Prašiči se tako bistveno manj razburijo.

Perkutano lahko kateteriziramo marginalno ušesno veno, veno safeno in veno cefaliko. Prašiče dobro sediramo s kombinacijo disociativnih anestetikov in benzodiazepinov (+/- agonisti adrenoceptorjev α_2 oziroma opioidi):

- tiletamin + zolazepam (Telazol[®]) 4 mg/kg IM (+/- ksilazin 0,5–1 mg/kg IM)
- ketamin 10 mg/kg IM + midazolam 0,5–1 mg/kg IM (+/- butorfanol 0,5 mg/kg IM).

Za uvod v anestezijo lahko uporabimo ketamin, tiopental ali propofol, odmerki pa je odvisen od premedikacije. Pri kombinaciji ketamin/midazolam/butorfanol potrebujemo za uvod v anestezijo 1–2 mg/kg propofola, anestezijo pa lahko vzdržujemo z inhalacijskimi ali injekcijskimi anestetiki (npr. propofol 15 mg/kg/h IV + fentanil 30–50 µg/kg/h IV). Če je le mogoče, ne uporabljamo halotana (nevarnost maligne hipertermije). Kot nosilni plin lahko uporabimo kisik ali mešanico kisika in zraka oziroma kisika in dušikovega oksidula. Vrednosti MAK za različne hlapne anestetike pri prašičih so navedene v preglednici 3.

Intubacija prašičev je nekoliko zahtevnejša zaradi specifične anatomije ustne votline in žrela (ozek, dolg gobec, grlo v obliki sifona). Intubiramo jih z direktno vizualizacijo žrela s hiperekstenzijo glave in vrata, pri čemer si pomagamo z laringoskopom z dolgim nastavkom. Prašiči imajo sorazmerno majhen premer sapnika v primerjavi z drugimi živalskimi vrstami. Prašiču težkemu 30 kg lahko vstavimo tubus št. 7 ali 8 (i.d. 7 oziroma 8 mm), medtem ko psu pasme nemški ovčar enake telesne teže ustreza tubus št. 12 ali celo 14. Uporabljamo lahko različne dihalne sisteme, najbolj ekonomičen je krožni dihalni sistem.

Med anestezijo poskrbimo za ustrezno temperaturo okolja oziroma za ogrevanje, saj se prašiči zelo hitro ohlajajo. Pozorni moramo biti tudi na morebitni razvoj maligne hipertermije, ki je posledica stresa in se konča s poginom, če ne pričnemo pravočasno zdraviti. Klinično opazimo rdečico kože, hitro naraščanje telesne temperature, hitro večanje vrednosti EtCO₂ (CO₂ na koncu izdihaja), mišično rigidnost z ekstenzijo okončin in razkrcenimi parklji. Zdravljenje ni vedno uspešno. Injiciramo dantrolen (2–10 mg/kg IV), poskušamo odpraviti stresni dejavnik (npr. prenehamo dovajati hlapni anestetik, če je ta vzrok) in čimprej končati anestezijo. Prašiča oksigeniramo s 100 % kisikom in intenzivno ohlajujemo.

PSI

Pri psih vstavljamo vensko kanilo najpogosteje v veno cefaliko, redkeje safeno ali jugularno veno. Jugularno veno uporabimo, kadar planiramo dajanje večjih količin infuzijskih raztopin ali merjenje centralnega venskega tlaka (CVP).

Pri psih je opisanih veliko različnih kombinacij anestetikov. Najpogosteje pse po premedikaciji s pomirjevalom in analgetikom uvedemo v anestezijo z injekcijskim anestetikom, anestezijo pa vzdržujemo s hlapnimi anestetiki samimi ali v kombinaciji z injekcijskimi anestetiki/analgetiki. Kot nosilni plin uporabimo kisik ali mešanico kisika in zraka ali mešanico kisika in dušikovega oksidula, pri čemer moramo upoštevati, da je vdišna frakcija kisika (FiO₂) najmanj 0,33 (najmanj 33 % kisika v vdihani zmesi plinov). V nadaljevanju sta opisani najpogostejši kombinaciji za anestezijo zdravih odraslih psov. Psa premediciramo s kombinacijo fenotiazinov (acepromazin 0,02 mg/kg IM) in opioidov (metadon ali morfij 0,3 mg/kg SC), ga uvedemo v anestezijo s propofolom 3 – 4 mg/kg IV ali tiopentalom 6–8 mg/kg IV, anestezijo pa vzdržujemo s hlapnim anestetikom. Lahko uporabimo tudi premedikacijo z medetomidinom (0,005–0,02 mg/kg IM), psa pa uvedemo v anestezijo s propofolom (0,5–2 mg/kg IV) ali tiopentalom (1–3 mg/kg IV). Učinke medetomidina po posegu običajno antagoniziramo z atipamezalom. Odmerek injekcijskega anestetika za uvod v anestezijo in inhalacijskega sredstva za vzdrževanje anestezije sta močno odvisna od premedikacije (redukcija odmerka lahko tudi do 90 %), kar velja za vse živalske vrste in ne samo za pse.

Psa sorazmerno enostavno intubiramo z direktno vizualizacijo grla. Lahko si pomagamo z laringoskopom, pri brahicefaličnih psih pa je uporaba laringoskopa nujna. Uporabljamo endotrahealne tubuse z mešičkom. Pri brahicefaličnih psih velikokrat ugotovimo brahicefalični sindrom, zaradi katerega imajo manjši premer sapnika kot drugi psi, kar moramo upoštevati pri izbiri endotrahealnega tubusa (npr. 25 kg angleškega buldoga intubiramo s tubusom št. 7, medtem ko nemškega ovčarja primerljive telesne teže intubiramo s tubusom št. 12).

Pri psih telesne teže do 3 kg uporabljamo podobne dihalne sisteme kot pri laboratorijskih glodavcih in kuncih (Ayrejev sistem T in njegove modifikacije), medtem ko pri psih težkih od 3

do 10 kg lahko uporabimo pediatrični krožni dihalni sistem. Pri psih, težjih od 10 kg, uporabimo krožni dihalni sistem za odrasle živali. Vrednosti MAK za različne hlapne anestetike pri psu so navedene v preglednici 3.

Standardni neinvazivni nadzor med anestezijo vključuje kapnometrijo, pulzno oksimetrijo, EKG, neinvazivno merjenje arterijskega tlaka in telesno temperaturo. Po potrebi monitoring razširimo na bolj invazivne metode (direktni tlak, centralni venski tlak, merjenje produkcije urina itd.).

MAČKE

Pri mačkah, enako kot pri psih, vstavljamo vensko kanilo najpogosteje v veno cefaliko, redkeje safeno ali jugularno veno. Jugularno veno uporabimo, kadar planiramo dajanje večjih količin infuzijskih raztopin ali merjenje centralnega venskega tlaka.

Pri mačkah je opisanih veliko različnih kombinacij anestetikov. Najpogosteje mačke po premedikaciji s pomirjevalom in analgetikom uvedemo v anestezijo z injekcijskim anestetikom, anestezijo pa vzdržujemo s hlapnimi anestetiki samimi ali v kombinaciji z injekcijskimi anestetiki/analgetiki. Enako kot pri psih, kot nosilni plin uporabimo kisik ali mešanico kisika in zraka ali mešanico kisika in dušikovega oksidula. V nadaljevanju sta opisani najpogostejši kombinaciji za anestezijo zdravih odraslih mačk. Za kratkotrajne kirurške posege (do 30 minut), pri katerih mačke niso intubirane, lahko uporabimo kombinacijo medetomidina (0,08 mg/kg) in ketamina (6–7 mg/kg), ki jo apliciramo intramuskularno. Uro in pol po posegu z atipamezolum (odmerek je enak 1/2 odmerka medetomidina v ml) antagoniziramo učinke medetomidina. Na ta način omogočimo hitrejše prebujanje. Če ni nujno (življenjsko ogrožena žival), atipamezola ne apliciramo prej, ker bo prebujanje za mačko neprijetno zaradi še prisotnih učinkov ketamina (mišična rigidnost, trzanje okončin, opistotonus, halucinacije). Kadar planiramo daljše posege, mačko premediciramo z manjšim odmerkom medetomidina (0,02 mg/kg) in ketamina (2–3 mg/kg) IM in jo uvedemo v anestezijo s propofolom (1 – 3 mg/kg IV), anestezijo pa vzdržujemo, tako kot pri psu, s hlapnim anestetikom ali kombinacijo hlapnega in injekcijskega anestetika. Po uvodu v anestezijo mačko intubiramo z endotrahealnim tubusom. Za mačko telesne teže 3–4 kg običajno uporabimo tubus št 4,0 ali 4,5. Pri napihovanju mešička smo zelo previdni, saj lahko s preveč napihnjenim mešičkom poškodujemo sluznico sapnika (ishemija in posledično nekroza tkiv) ali v najslabšem primeru celo povzročimo rupturo sapnika. Mačke vedno intubiramo s pomočjo laringoskopa. Ker imajo izrazit grlni refleks, jih intubiramo šele v globoki anesteziji, saj pri poskusu intubacije v preplitvi anesteziji izzovemo laringospazem. Občutljivost sapnika lahko zmanjšamo s topikalnim nanosom lidokaina.

Pri mačkah telesne teže do 3 kg uporabljamo podobne dihalne sisteme kot pri laboratorijskih glodavcih in kuncih (Ayrejev sistem T in njegove modifikacije), medtem ko pri težjih lahko uporabimo pediatrični krožni dihalni sistem. Vrednosti MAK za različne hlapne anestetike pri mački so navedene v preglednici 3.

Mačke nadziramo med anestezijo enako kot pse. Zaradi majhne telesne mase in sorazmerno velike telesne površine smo še posebej pozorni na ohranjanje telesne temperature med anestezijo.

Preglednica 3: MAK (%) za različne hlapne anestetike pri različnih živalskih vrstah.

Anestetik	Kunec	Podgana	Miš	Pes	Mačka	Prašič	Ovca
Halotan	0,8–1,56	0,81–1,23	0,95–1,59	0,86–0,93	0,99–1,19	0,9–1,25	0,97
Izofluran	2,05–2,12	1,17–1,58	1,31–1,77	1,28– 1,5	1,28–2,21	1,45–2,04	1,58
Sevofluran	3,7	2,5–2,99	2,7	2,1–2,36	2,58–3,41	1,97–2,66	3,3

MAK ali minimalna alveolarna koncentracija hlapnega anestetika je koncentracija, pri kateri se 50 % živali ne odzove na kirurški dražljaj (npr. kožni rez). Pri 1,3 MAK se na kirurški dražljaj ne odzove 90 % živali. MAK se lahko razlikuje znotraj živalske vrste (odvisno od pasme in

seva živali). MAK znižajo sredstva za premedikacijo, slabo splošno stanje živali in hipotermija. MAK je nižji pri starejših živalih. MAK zvišajo hipertermija, vznemirjenost; višji je tudi pri mladih.

ANALGETIKI IN PROTIBOLEČINSKA TERAPIJA

Prepoznavanje bolečine je ključnega pomena za uspešno preprečevanje in odpravljanje le-te, saj je živali ne morejo opisati tako kot ljudje. Izražanje bolečine je vrstno specifično, odvisno pa je tudi od številnih drugih dejavnikov kot so genetska linija znotraj posamezne živalske vrste, spol, teža, predhodne izkušnje, socialna dominanca, splošno stanje živali in vplivi okolja v času opazovanja živali. Na prepoznavanje bolečine vplivajo poznavanje normalnega obnašanja posamezne živali oziroma živalske vrste, izkušnost ter znanje osebe, ki ocenjuje stanje živali, in odnos ocenjevalca do zdravljenja bolečine. Na splošno sprejeta doktrina je, da živali, ki imajo podobno razvit živčni sistem kot ljudje, enako zaznavajo bolečino. Vsak postopek ali poškodba, pri katerih ljudje čutimo in tudi opišemo bolečino, so enako boleče tudi za živali, čeprav te pri tem ne pokažejo nam očitnih znakov bolečine.

Znaki bolečine pri laboratorijskih glodavcih in kunih: zmanjšana telesna aktivnost, živali čepijo v kotu kletke in se ne zanimajo za okolico, občasno so nenavadno nemirne, spremenjena drža (po abdominalnih operacijah se držijo zgrbljeno), lahko se zmanjšata frekvenca uriniranja in defeciranja (ker pri zavzemanju položaja za uriniranje oz. defeciranje čutijo bolečino), živali si ne čistijo kožuha, so umazane okoli anusa, pojavi se zasušeni izcedek okoli oči, nosa in ust (zlasti pri podganah), prej miroljubne živali lahko postanejo agresivne oziroma prej aktivne živali so apatične, živali, navajene človeškega dotika se skrivajo in izogibajo kontaktu s človekom, občasno se oglašajo pri visokih frekvencah, ki pa jih človek ne sliši, so neješčje, shušajo in dehidrirajo.

Znaki bolečine pri ovcah: zmanjšana aktivnost, apatičnost, nezanimanje za okolico, rigidna drža, znaki kolike podobno kot pri konjih, vendar manj izraziti, škrtanje z zobmi, stokanje, prej mirne živali lahko postanejo agresivne.

Znaki bolečine pri prašičih: spremenjeno socialno obnašanje, vokalizacija, ki pa je izrazitejša pri poskusu rokovanja s prašičem, spremenjena drža, odpor do gibanja, skrivanje v steljo.

Znaki bolečine pri psih: apatičnost, neješčnost, cviljenje, stokanje, zgrbljena drža (pri abdominalni bolečini), ne upajo ležati in stojijo ves čas (pri bolečini v prsnem košu), znaki agresije pri dotikanju bolečega mesta, neuporaba prizadete okončine, slinjenje in odklanjanje hrane pri bolečini v ustni votlini.

Znaki bolečine pri mačkah: pihajo ali renčijo, nekatere se poskušajo skriti ali pobegniti pri dotikanju bolečega mesta, zgrbljena drža pri bolečini v trebušni votlini, manj se gibljejo in ne kažejo zanimanja za okolico, se ne čistijo in imajo zanemarjen kožuh, odklanjajo hrano in stike s človekom (prostoživeče mačke se zavlečejo na nedostopno mesto ali se sploh ne vrnejo domov). Pri močni bolečini pospešeno dihaajo, pri prebujanju iz anestezije po bolečih posegih brez ustrezne analgezije pa lahko pride celo do manične reakcije. Mačke se mečejo po kletki, grizejo obvezo, nas poskušajo napasti, renčijo in zavijajo. Znaki kronične bolečine so bolj subtilni in nemalokrat jih spregledamo. Mačke so manj aktivne, ne zanimajo se za okolico, telesna teža se zmanjša na račun neješčnosti. Pri lokalizirani bolečini so znaki bolj specifični; npr. pri bolečini v ustni votlini grizejo z manj prizadeto stranjo gobca, šepajo na prizadeto okončino, mišice okončine, ki je ne obremenjujejo, so atrofične. Kadar je prizadetih več sklepov, hodijo zvezano.

Pri preprečevanju oziroma zdravljenju bolečine ima pomembno vlogo čas dajanja analgetika. Številne študije so potrdile, da dajanje analgetikov pred bolečinskim dražljajem (angl. t. i. preemptive analgesia) prepreči centralno senzibilizacijo in zmanjša oziroma omeji periferno vnetje, hkrati pa se zmanjša odmerek anestetikov, potrebnih za uvod in vzdrževanje splošne anestezije. Bolečina je kompleksen proces, ki ga ne moremo zdraviti oziroma preprečiti z eno samo vrsto analgetika, zato boljši uspeh dosežemo s kombiniranjem različnih vrst analgetikov, ki delujejo na različnih receptorskih mestih v telesu. Govorimo o multimodalnem pristopu, kjer kombiniramo opioide z nesteroidnimi analgetiki, lokalnimi analgetiki/anestetiki in drugimi analgetiki. Odmerki nesteroidnih analgetikov in opioidov pri različnih živalskih vrstah so opisani v preglednicah 4–6.

Preglednica 4: Nesteroidni analgetiki in opiodi pri laboratorijskih glodavcih.

	Miš	Podgana	Morski prašiček	Hrček
Nesteroidni analgetik				
Karprofen	5–10 mg/kg/24 h SC	4–5 mg/kg/24 h SC	4 mg/kg/24h SC 1–2 mg/kg/12–24h PO	5 mg/kg/24 h SC
Meloksikam	5–10 mg/kg/24 h PO, SC, IM	2 mg/kg/24 h PO, SC, IM	0,1–0,3 mg/kg/24 h PO, SC PO – SC	?
Opioid				
Morfin	2–5 mg/kg/2–4 h SC	2–5 mg/kg/2–4 h SC	2–5 mg/kg/4 h SC	2–5 mg/kg/2–4 h SC
Petidin	10–20 mg/kg/2–3 h SC, IM	10–20 mg/kg/2–3 h SC, IM	10–20 mg/kg/2–3 h SC, IM	20 mg/kg/2–3 h SC, IM
Butorfanol	0,2–2 mg/kg/2–4 h SC, IP, IM 1–5 mg/kg/4 h SC	0,2–2 mg/kg/2–4 h SC, IP, IM	0,4–2 mg/kg/4–12 h SC	1–5 mg/kg/4 h SC
Buprenorfin	0,05–0,1 mg/kg/8–12 h SC	0,01–0,05 mg/kg/8–12 h SC, IV 0,1–0,25 mg/kg/8–2 h PO	0,05 mg/kg/8–12 h SC	0,01–0,05 mg/kg/8–12 h SC, IV

Preglednica 5: Nesteroidni analgetiki in opiodi pri kuncu, ovci in prašiču.

	Kunec	Ovca	Prašič
Nesteroidni analgetik			
Karprofen	4 mg/kg/24 h SC 1,5 mg/kg/12 h PO	0,7–4 mg/kg/24 h SC, IV do 3 dni	2–4 mg/kg/24 h SC, IV, PO do 4 dni
Meloksikam	0,1–0,2 mg/kg/24 h SC, IM, PO	0,5 mg/kg/24 h IV, SC, PO do 5 dni	0,4 mg/kg/24 h IM, SC, PO do 4 dni
Opioid			
Morfin	2–5 mg/kg/2–4 h SC, IM	0,2–0,5 mg/kg/2–4 h IM	0,2–1 mg/kg/4 h IM
Petidin	5–10 mg/kg/2–3 h SC, IM	2 mg/kg/2–4 h IM, IV	2 mg/kg/2–4 h IM, IV
Butorfanol	0,1–0,5 mg/kg/4 h SC, IM, IV	0,1–0,5 mg/kg/2–3 h IM, SC, IV	0,1–0,5 mg/kg/4–6 h IM, SC
Buprenorfin	0,01–0,05 mg/kg/6–12 h SC, IM, IP, IV	0,005–0,01 mg/kg/4 h IM, IV, SC	0,005–0,1 mg/kg/4–12 h IV, IM, SC

Preglednica 6: Nesteroidni analgetiki in opiodi pri psu in mački.

	Pes	Mačka
Nesteroidni analgetik		
Karprofen	4 mg/kg IV, SC, PO 1x, nato 2 mg/kg/12 h PO	do 4 mg/kg SC, IV 1x
Meloksikam	0,2 mg/kg IV, SC, PO 1. dan, nato 0,1 mg/kg/dan PO	0,2 mg/kg PO, SC, IV prvi dan, nato 0,1 mg/kg PO/24 h do največ 4 dni, nato 0,05 do 0,1 mg/kg PO vsak 2. ali 3. dan
Robenakoksib*	1 mg/kg/dan SC perioperacijsko, nato PO	1 mg/kg SC perioperacijsko, nato PO do največ 6 dni
Firokoksib	5 mg/kg/dan PO	NE PRI MAČKI!
Mavakoksib	2 mg/kg, 2. odmerek čez 14 dni, 3. – 7. odmerek/mesec dni PO	NE PRI MAČKI!
Opioid		
morfij	0,1–1,0 mg/kg IM, SC, učinkuje 1,5–3 h	0,1–0,3 mg/kg IM, SC, učinkuje 6–8 h
metadon	0,1–1,0 mg/kg IM, SC, učinkuje 4–6 h	0,1–0,3 mg/kg IM, SC, učinkuje 6–8 h
fentanil injekcije, obliž	injekcije: 1–4 mikrog/kg IV, učinkuje 15–20 min obliž: 2–5 mikrog/kg/h, učinkuje 3 dni	injekcije: 1–4 mikrog/kg IV, učinkuje 15–20 min obliž: 2–5 mikrog/kg/h, učinkuje 6 dni
buprenorfin	0,006–0,01 mg/kg IM, IV, učinkuje 6–8 h	0,006–0,01 mg/kg IM, IV, učinkuje do 12 h
butorfanol	0,2–0,4 mg/kg IV, IM, SC, učinkuje 30–40 min	0,2–0,4 mg/kg IV, IM, SC, učinkuje 1–2,5 h
tramadol	5–10 mg/kg SC, IM, PO, rektalno, učinkuje 8–12 h	do 3 mg/kg SC, IM, PO, učinkuje 8–12 h

*Pri živalih lažjih od 3 kg ni možno PO doziranje (tablete se ne smejo drobiti).

ZAKLJUČEK

Osnovna načela anestezije in analgezije laboratorijskih živali so enaka kot pri drugih domačih živalih. Poznavanje vrstno specifičnih razlik v anatomiji, fiziologiji in obnašanju posameznih živalskih vrst je pogoj za kvalitetno anestezijo in zagotavljanje dobrega počutja živali v pooperacijskem obdobju.

LITERATURA

1. Carpenter JW. Exotic animal formulary. 3rd ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2005.
2. Celly CS, Atwal OS, McDonell WN, Black WD. Histopathologic alterations induced in the lungs of sheep by use of alpha2-adrenergic receptor agonists. Am J Vet Res 1999; 60: 154–61.
3. Erhardt W, Wohlrab S, Kilic N, Werner C, Henke J. Comparison of the anaesthesia combinations racemic-ketamine/medetomidine and S-Ketamine/medetomidine in syrian

- golden hamsters (*mesocricetus auratus*). *Vet Anaesth Analg* 2001; 28: 212–3.
4. Flecknell P. Laboratory animal anaesthesia. 2nd ed. London: Academic Press, 1996.
 5. Flecknell P, Waterman-Pearson A. Pain management in animals. London: W.B. Saunders, 2000.
 6. Hall LW, Clarke KW, Trim CM. Veterinary anaesthesia. 10th ed. Edinburgh: W.B. Saunders, 2001.
 7. Hellebrekers LJ. Animal pain. Utrecht: Van der Wees, 2000.
 8. Nunez JL, Koss WA, Juraska JM. Hippocampal anatomy and water maze performance are affected by neonatal cryoanesthesia in rats of both sexes. *Horm Behav* 2000; 37: 169–78.
 9. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Grimm KA. Lumb & Jones' Veterinary anesthesia and analgesia. 4th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2007.
 10. University of California, San Francisco. The institutional animal care and use committee (IACUC). http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awA&A_O.asp (12. 10. 2012)
 11. Waterman AE, Livingston A. Effects of age and sex on ketamine anesthesia in the rat. *Br J Anesth* 1978; 50: 885.

UVOD

Vsa zakonodaja na področju zaščite poskusnih živali izhaja iz osnovnega načela, da je pod določenimi pogoji moralno sprejemljivo uporabiti živali v poskusne in druge znanstvene namene. Prva uporaba živali v poskusih sega v čas antike in sovпада z začetki medicinske znanosti. Najbolj poznani naravoslovci tega obdobja, ki so svoje trditve podkrepili tudi s poskusi na živalih, so bili Aristotel, Erasistratus in Hipokrat. Začetniki moderne medicine in kirurgije so Ambroise Pare, John Hunter in Joseph Lister. Kirurgija zanje ni bila le znanost in tehnika, ampak so pri svojem delu uporabili tudi znanje anatomije, fiziologije, patologije in mikrobiologije. Do novih spoznanj in znanj so prišli sami z nadzorovanimi kliničnimi poskusi in poskusi na živalih. Ker je prišlo do visokega porasta uporabe živali v poskusne namene, so se gibanja za zaščito poskusnih živali močno razplamtela in že v šestdesetih letih 19. stoletja dosegla politično areno. Znanstveniki in različne organizacije so iskali rešitve in metode, s katerimi bi lahko nadomestili poskuse na živalih ali vsaj zmanjšali uporabo živali v poskusih, in tako sta William Russell in Rex Burch leta 1959 objavila knjigo z naslovom *The principles of human experimental technique*, v kateri sta zasnovala načela, ki jih danes poznamo pod izrazom koncept 3R, kar pomeni zamenjati predvideno metodo z alternativno (angl. replacement), izbrati poskus, ki zahteva najmanjše število živali (angl. reduction) in izboljšati pogoje bivanja živali in postopke, ki se izvajajo na živalih tako, da bodo utrpele čim manj nelagodja, bolečin ali trpljenja (angl. refinement).

Znanost temelji na spoznanjih in rezultatih, dobljenih s pomočjo raziskav, ki morajo biti ponovljive, preverljive in primerljive. Mednje sodijo raziskave, načrtovane s pomočjo *in vivo* poskusov, kjer ima svoje mesto tudi eksperimentalna kirurgija. Eksperimentalne kirurške tehnike se načeloma ne razlikujejo od klasičnih. Za kakovostno izvedbo raziskave in za etično uporabo živali je treba upoštevati vsa načela, ki jih uporabljamo v klinični kirurgiji.

OSNOVNI PRINCIPI ASEPSE, DEZINFEKCIJE IN STERILIZACIJE

Infekcija rane je vsakdanji, potencialno nevaren in pogosto drag zaplet po kirurškem posegu. Kljub preprečevanju bakterijske kontaminacije med kirurškim posegom in široko razširjeni uporabi antibiotikov se kirurška rana okuži pri približno 5 % živalih. Žival lahko okužbo s svojim imunskim sistemom hitro premaga, lahko pa okužba ogrozi življenje živali. Vse več zapletov povzročajo bakterije, odporne na antibiotike. Okužbe z bakterijami, odpornimi na antibiotike, je težko pozdraviti z ustreznim zdravljenjem z antibiotiki in lahko povzročijo hujše zaplete in celo smrt. Za uspešno zmanjšanje kontaminacije rane in preprečitev okužbe je zato nujno dosledno upoštevanje načel aseptičnih tehnik.

Aseptične tehnike so tisti postopki in dejanja, ki preprečijo kontaminacijo rane med kirurškim posegom. Današnje aseptične tehnike vključujejo posebno pripravo pacienta (kirurškega polja na živali), kirurškega osebja, kirurškega inštrumentarija in operacijske dvorane. Mikrobiološka kontaminacija in okužba rane ne moreta nastati, če mikroorganizme popolnoma odstranimo. Ker vseh mikroorganizmov iz operacijske dvorane in kirurškega polja ni mogoče odstraniti, z upoštevanjem aseptičnih tehnik dosežemo, da je rana izpostavljena tako majhnemu številu mikroorganizmov, da v normalnih okoliščinah niso nevarni. Za dobro razumevanje različnih izrazov s področja asepse, dezinfekcije in sterilizacije so najpogostejši izrazi razloženi v preglednici 1.

Preglednica 1: Najpogostejši izrazi s področja asepse, dezinfekcije in sterilizacije.

Kirurška okužba	Okužba, do katere pride v 30 dneh po kirurškem posegu. Pri kirurških implantatih so to okužbe, ki nastanejo v 1 letu po posegu.
Asepsa	Odsotnost patogenih mikroorganizmov v živih tkivih.
Sepsa	Prisotnost patogenih mikroorganizmov in njihovih toksinov v krvi in drugih tkivih ter izzivanje obrambe imunskega sistema s kliničnimi znaki, kot so hipertermija, tahikardija, tahipneja, levkocitoza ali levkopenija.
Antisepsa	Lokalno uničevanje kužnih mikroorganizmov z antiseptiki. Nekateri antiseptiki so lahko razredčene oblike dezinficijensov, ki ob uporabi ne povzročajo poškodb na tkivih.
Antiseptik	Snov, ki uničuje mikroorganizme na koži in sluznicah in preprečuje njihovo razmnoževanje.
Aseptične tehnike	Postopki in dejanja, ki preprečijo kontaminacijo rane med kirurškim posegom.
Sterilizacija	Uničevanje vseh mikroorganizmov, patogenih in nepatogenih, ter njihovih spor s kemičnimi ali fizikalnimi metodami.
Dezinfekcija ali razkuževanje	Odstranitev in uničevanje večine patogenih mikroorganizmov (ne nujno tudi njihovih spor) s predmetov, snovi in okolja.
Dezinficiens ali razkužilo	Kemične snovi, ki delujejo bakteristatično (zavirajo rast mikroorganizmov) in baktericidno (ubijajo mikroorganizme). Spor ne uničijo. Ker so te snovi bolj toksične kot antiseptiki, jih uporabljamo le na delovnih površinah in inštrumentih.

KIRURŠKI POSEGI NA POSKUSNIH ŽIVALIH

Eksperimentalni kirurški posegi na večjih živalih potekajo praviloma v operacijskih dvoranah, kjer veljajo enaki pogoji in načela, ki jih uporabljamo v klinični kirurgiji.

Za večino **eksperimentalnih kirurških posegov na glodavcih** ne potrebujemo posebnega prostora, zadostuje že majhen prostor v laboratoriju, ki je odmaknjen od drugih aktivnosti v prostoru, da čim bolj zmanjšamo kontaminacijo med kirurškim posegom. Na mestu (mizi, pultu), kjer se opravljajo posegi, ne smejo istočasno potekati drugi procesi. Delovna površina mora biti iz materiala, ki ga je enostavno razkuževati, biti mora nepropusten in trajen.

Kirurške posege na živalih, ki jih takoj po posegu evtanaziramo in pri katerih morebitna medoperativna kontaminacija ne vpliva na rezultate poskusa, lahko opravimo tudi brez upoštevanja načel asepse. Vendar pa morajo biti vsi posegi, pri katerih živali preživijo, opravljeni aseptično, kar pomeni, da mora kirurg nositi sterilne rokavice, masko, uporabljati mora sterilne inštrumente in aseptične tehnike. Inštrumente lahko steriliziramo z visoko temperaturo ali paro, če so občutljivi, jih steriliziramo s plinom. Po navodilu proizvajalca lahko inštrumente steriliziramo tudi s kemično metodo. Ker lahko kemikalije dražijo kožo in tkiva, je treba inštrumente, ki so bili sterilizirani kemično, temeljito sprati s fiziološko raztopino. Razlika pri opravljanju poskusa na večjih živalih od tistih, ki se opravljajo na glodavcih, je predvsem v tem, da poteka pri večjih živalih poskus na eni živali, medtem ko opravimo na glodavcih celo serijo poskusov istočasno. Če opravljamo poskus istočasno na 5, 10, 25, 50 ali celo na

100 živalih, bi bilo zelo nepraktično uporabljati npr. 50 kirurških setov, zato je treba razmere prilagoditi, da lahko poskus uspešno izvedemo. Navadno zadostuje, da začnemo s sterilnimi instrumenti, med posameznimi živalmi pa za vzdrževanje aseptičnih pogojev steriliziramo tiste instrumente, ki bi jih ponovno uporabili. Če se instrumenti močno kontaminirajo, npr. če padejo na tla, je kirurški set najbolje zamenjati s sterilnim ali ga ponovno sterilizirati pred nadaljevanjem poskusa. V izjemnih primerih lahko uporabimo razkužila na osnovi klordioksida, ki instrumente razkužijo v manj kot 10 minutah, sicer pa se rutinska uporaba razkužil za sterilizacijo instrumentov ne priporoča, ker sčasoma poškodujejo nerjavno jeklo. Hitro sterilizacijo instrumentov lahko dosežemo s kvarčnim sterilizatorjem, ki je namenjen hitri sterilizaciji (10–20 sekund) kovinskih in keramičnih instrumentov med samim delom.

PRIPRAVA ŽIVALI

Koža in dlaka živali sta pomemben rezervoar bakterij, zato lahko kirurški poseg opravimo aseptično le, če pred posegom pravilno pripravimo kirurško polje, tj.:

- odstranimo dlake,
- očistimo (če je na koži prisotna makroskopska umazanija) in razkužimo kožo na predelu, kjer bo predvidoma potekal kirurški rez,
- kirurško polje pokrijemo.

Odstranjevanje dlak

Odvisno od velikosti živali in področja, ki ga je treba obriti, uporabimo za odstranjevanje dlak električni brivnik z glavo št. 40, manjši brivnik na baterije, dlake lahko populimo ali uporabimo depilacijsko kremo. Pri malih živalih naj bo kirurško polje pobrito vsaj 1 cm okoli mesta incizije, pri velikih živalih pa vsaj 5 cm. Pri odstranjevanju dlak je treba paziti, da kože ne poškodujemo, npr. odrgnemo ali opraskamo, ker se na poškodovano kožo hitro kolonizirajo bakterije.

Priprava kože poskusne živali

Po odstranitvi dlak razkužimo kožo; če je prisotna makroskopska umazanija, jo najprej **umijemo**. Kožo lahko umijemo z razkužilnim milom, ki vsebuje povidon jodid. Po umivanju kožo popolnoma osušimo. Kože ne moremo sterilizirati, lahko jo le **razkužimo**, pri čemer uničimo kontaktno mikrofloro in čim bolj zmanjšamo lastno floro, ki se zadržuje v globljih slojih kože poskusne živali (dlačnih foliklih in kožnih žlezah). Lastna flora med operacijo kolonizira površino kože in je tako vir kontaminacije kirurške rane, zato je pomemben remanentni učinek razkužila. Če uporabljamo alkohol, moramo biti zelo pazljivi glede količine, ker alkoholna razkužila povzročijo še hitrejšo ohlajanje, kot če uporabimo jodove pripravke. Kožo razkužimo tako, da na čisto in suho kožo naneseemo razkužilo (navadno obarvano), počakamo 1 minuto, postopek ponovimo in, ko je koža suha, začnemo s posegom.

Prekrivanje kirurškega polja

Za nekatere kirurške posege je izjemno pomembno, da kirurško polje prekrijemo s kompresami in tako omogočimo opravljanje aseptičnih tehnik. Uporaba kompres npr. prepreči kontaminacijo katetra med katetrsko kirurgijo v jugularni veni ali femoralni arteriji. Prav tako vzdržujemo aseptične pogoje s prekrivanjem kirurškega polja pri vseh večjih posegih v telesnih votlinah, kjer je za dostop potreben večji rez. Pri nekaterih posegih, npr. pri opravljanju črevesnih anastomoz, je treba organe v trebušni votlini premakniti in jih izvleči, da pridemo do mesta, kjer bomo napravili poseg. V takem primeru bi bila kontaminacija neizogibna, če kirurško polje ne bi bilo prekrito s sterilnimi kompresami.

PRIPRAVA KIRURGA

Kirurg, ki opravlja poskus, mora imeti primerno izobrazbo. Če opravlja kirurg številne poskuse, npr. 4–8 ur na dan, naj bo kirurg napravljen enako, kot če bi opravljal poskus na večji živali. Kirurška oblačila, obuvala, maske in kape predstavljajo nesterilno bariero, ki zmanjša, ne pa tudi odstrani kroženje skupnega števila snovi po kirurški dvorani, med katere sodijo tudi mikroorganizmi. Minimalne zahteve za opravljanje poskusov na glodavcih so nošenje maske ter plašča ali čiste bele halje.

Umivanje rok

Po namestitvi maske (in kape) naj si kirurg roke le v primeru, da ima prisotno makroskopsko umazanijo, kratko 15 do 20 sekund umije z balgim milom, jih dobro spere in povsem osuši, da ne razredči dezinfekcijskega sredstva. Umivanje rok z mili namreč odstranjuje kožno bariero, ker kožo izsuši, dezinfekcija kože pa tudi do 100-krat uspešneje zmanjša število mikroorganizmov s kože kot uporaba modernih aseptičnih mil. Uporaba ščetke pri umivanju rok se vse bolj opušča, ker nastanejo pri ščetkanju na koži mikroskopske poškodbe, milo še dodatno draži kožo in pri pogostem umivanju se koža zaradi oslabiljene obrambne funkcije vname. Nadražene in vnete kože pa ni več mogoče primerno razkužiti.

Razkuževanje rok

Kirurško razkuževanje rok naj traja 3-5 minut. Roke se razkužijo tako, da se v večkratnih nanosih nanese na nje po 1,5–3 ml alkoholne raztopine. Pomembno je, da ima kirurg roke ves čas razkuževanja prepojene z razkužilom in da si rok na koncu ne obriše, pač pa se razkužilo z vtiranjem posuši. V prvi fazi se razkuži dlani in podlakti do komolcev, v drugi fazi se razkuži dlani in roke do polovice podlakti, na koncu pa se razkuži le roke vključno z zapestjem in pri tem drži roke ves čas nad nivojem komolca. Razkužila nikoli ne nanašamo na vlažno kožo, na ta način bi ga razredčili in zmanjšali njegovo učinkovitost. Za razkuževanje rok je navadno potrebnih 15-25 ml razkužila. Uporabljamo razkužila, ki imajo za aktivno snov kombinacijo alkoholov, ponavadi 1-propanola in 2-propanola. V razkužilu mora biti vsaj 70 % alkohola. Razkužila so sestavljena iz aktivne snovi in pomožnih snovi. Pomožne snovi so barve, dišave, vlažilci kože. Poleg pomožnih snovi je alkoholu dodana še snov, ki omogoča t. i. remanentni učinek delovanja razkužila, kar pomeni, da deluje skozi daljše časovno obdobje, ponavadi do treh ur. Za doseganje remanentnega učinka razkužilom dodajajo mecetronium etil sulfat ali klorheksidin.

Kirurški plašči in rokavice

Po razkuževanju rok sledi oblačenje sterilnega kirurškega plašča, pri čemer kirurgu pomaga asistent. Sterilni kirurški plašči predstavljajo dodatno bariero med kirurgom in poskusno živaljo. Materiali, iz katerih so plašči, morajo preprečiti prenos mikrobov skozi plašč, biti morajo odporni na kri in druge tekočine in ne smejo oddajati prašnih delcev.

Ko ima kirurg oblečen kirurški plašč, si obleče sterilne rokavice po zaprti metodi, da se še dodatno zmanjša možnost kontaminacije. Metoda temelji na principu, da se kirurg z rokami nikoli ne dotakne zunanjega dela rokavic. Ker ima do 25 % rokavic po operaciji manjše perforacije, ki nastanejo, ne da bi kirurg za to vedel, je pri pravilnem razkuževanju rok kirurga nevarnost kontaminacije rane minimalna.

Povzetek minimalnih standardov, ki so potrebni za opravljanje čistih/aseptičnih posegov na večjem številu glodavcev:

- zagotovitev čistega/sterilnega polja
- odstranjevanje dlak z operativnega polja
- razkuževanje operativnega polja
- nošenje čistih oblačil (halja), maske, kape in po potrebi sterilnega kirurškega plašča
- umivanje rok z milom, razkuževanje z razkužilom
- uporaba sterilnih kirurških rokavic, ki jih kirurg takoj zamenja, če pride do kontaminacije ali če se rokavice poškodujejo (perforirajo)

- uporaba sterilnih kirurških inštrumentov in razkuževanje med posameznimi postopki (na različnih živalih)
- uporaba sterilnega sanitetnega (tamponi, zloženci, trebušne komprese) in šivalnega materiala

KIRURŠKI INŠTRUMENTARIJ

Kirurški inštrumenti so vsa orodja, ki jih uporabljamo v operativnem polju. Skupne zahteve za kirurške inštrumente so lahko in hitro čiščenje, sposobnost za avtoklaviranje, čvrstost, enostavnost, uporabnost za več vrst operacij. Kirurški inštrumenti imajo funkcionalni in držalni del. Narejeni so iz nerjavnega jekla. Deli inštrumentov, ki morajo biti posebno močni, so lahko narejeni iz posebno trdnega plemenitega jekla karbida, fini inštrumenti pa so narejeni iz titana. Inštrumente višjega kakovostnega razreda prepoznamo po galvansko pozlačenem držalnem delu. Inštrumente čistimo z umivanjem, uspešna je uporaba ultrazvoka. Oblika kirurških inštrumentov je prilagojena funkciji in kirurgu, velikost pa obliki operativnega polja in vrsti živali.

Kirurški inštrumenti so:

- inštrumenti za prekinjanje tkiva (skalpeli, škarje, žage, žličke ...)
- prijemalni inštrumenti
- držalni inštrumenti
- specialni inštrumenti

Inštrumenti za prekinjanje tkiva

Skalpel ali kirurški nož je sestavljen iz držala in rezila, sestavljenega držimo v roki kot svinčnik. Funkcija skalpela je ostro prekinjanje mehkih tkiv. Najpogosteje uporabljena so držala št. 3 in 4, na katera namestimo rezila za enkratno uporabo. Poznamo več vrst rezil, ki se ločijo po obliki in velikosti. Držalo št. 3 uporabljamo za manjša rezila (10, 11, 12, 15), držalo št. 4 pa za večja rezila (20 in 22). Najpogosteje uporabljeno je rezilo št. 10.

Škarje so sestavljen inštrument, so iz dveh gibljivih delov. V osnovi ločimo dve vrsti škarij, **preparirne škarje** in **škarje za rezanje šivalnega materiala** (ki se razlikujejo od škarij za odstranjevanje šivov). Preparirne škarje imajo gladki zaobljeni rezili, da ne povzročajo poškodb tkiv, uporabljamo jih za ostro prekinjanje ali topo razmikanje. Škarje bolj poškodujejo tkivo ob rezni ploskvi kot skalpel. Glede na obliko konice ločimo ostre-ostre, ostre-tope in tope-tope škarje, glede na obliko rezila jih delimo na ravne in ukrivljene ter glede na rob rezila na navadne in nazobčane.

Prijemalni inštrumenti

Pincete so prijemalni inštrument, zanesljivo držijo tkivo in ga čim manj poškodujejo. Pincete držimo v roki kot svinčnik. Delimo jih na anatomske oziroma atravmatske in kirurške oziroma travmatske. Kirurška pinceta je osnovni prijemalni inštrument v kirurgiji. Kraka imata v funkcionalnem delu enega ali več zobcev, ki se prilegajo utorom na drugem kraku. S kirurško pinceto ne prijemamo ranljivih struktur, kot so žile in živci. Anatomska pinceta je enostavni prijemalni inštrument, funkcionalni del ima zrnato ali narezano površino, pincete z ozkimi, dolgimi kraki imajo zatič. Anatomska pinceto uporabljamo za prijemanje in zadrževanje ranljivih tkiv, za prijemanje niti in polaganje različnega materiala.

Prijemalke – poznamo jih več vrst. **Prijemalko za čiščenje** uporabljamo za prijemanje in držanje materialov za čiščenje kirurškega polja ter za pobiranje inštrumentov ali sanitetnega materiala iz sterilne kasete. Za pripenjanje kompresa na operativno polje uporabljamo **prijemalke po Backhausu** oziroma t. i. hrošče. **Prijemalke po Peanu** imajo funkcionalna kraka nazobčana in sta lahko ravna ali ukrivljena, konca pa zaobljena ali koničasta. Uporabljamo jih za prijemanje tkiv in krvnih žil, za držanje niti ter za topo razmikanje tkiva. **Prijemalke po Doyenu** uporabljamo za prijemanje črevesja pri resekciji ali enterotomiji. Inštrument ima zelo nežne prijemalke, da ne poškoduje črevesne stene.

Šivalniki so sestavljen prijemalni inštrument, funkcionalna kraka sta ravna, običajno zaobljena. Uporabljamo ga za držanje in vodenje igle skozi tkivo ter za vozlanje. Šivalnikov je več vrst.

Najpogosteje uporabljamo šivalnik po Mayo-Hegarju. Nekateri šivalniki imajo vgrajene škarje za rezanje šivov. Primer takega šivalnika je šivalnik po Gilliesu. Boljši šivalniki imajo funkcionalno površino prevlečeno s karbidom, ki omogoča daljšo življenjsko dobo šivalnika, poleg tega pa manj poškodujejo iglo.

Držalni inštrumenti

Držalni inštrumenti ali **retraktorji** v rani razpirajo tkiva in jih zadržujejo v določenem položaju, s tem omogočajo preglednost globokih struktur v operativnem polju. Ločimo jih na **kljuke in grabljice**, ki jih praviloma uporabljamo v parih in jih drži asistent, ter **samodržce**. Med samodržce uvrščamo retraktor po Gelpiju, abdominalni retraktor po Balfourju, torakalne retraktorje, ortopedske retraktorje ipd.

OSNOVE KIRURŠKE TEHNIKE

Ker imajo glodavci nizko telesno težo, je lahko že majhna izguba krvi nevarna in je treba krvavitev takoj ustavljati. Pri operacijah, kjer pričakujemo večje krvavitve, je za doseganje hemostaze zelo primerna bipolarna kavterizacija krvnih žil.

Med samim kirurškim posegom so zelo pomembni:

- anestezijski monitoring
- spremljanje telesne temperature
- spremljanje izgube telesnih tekočin
- zagotavljanje hemostaze
- zapiranje rane

Kadar naredimo večji kirurški rez, je tako pri večjih živalih kot pri glodavcih zelo pomembno zapiranje kirurške rane v več plasteh. Če je rez majhen (manj kot 5 mm), mišične plasti ni treba šivati in lahko rano zapremo s kovinskimi sponkami. Zapiranje rane s kovinskimi sponkami je hitro in enostavno, zapletov pri celjenju pa je minimalno, če sponke pravilno namestimo. Če rano zašijemo, uporabimo pri glodavcih za šivanje kože enojne šive iz neresorbilnega šivalnega materiala, ker so glodavci nagnjeni k lizanju in grizenju kirurške rane. Alternativa je namestitev resorbilnih intradermalnih šivov. Pri večjih živalih zapiramo rano podobno, le da lahko pri teh živalih preprečimo lizanje rane z namestitvijo zaščitnega ovratnika.

ŠIVALNI MATERIALI IN IGLE

Šivalne materiale razdelimo na več načinov, praktična delitev temelji na sestavi in razgradljivosti. Glede na razgradljivost jih delimo na **neresorbilne** in **resorbilne**, neresorbilni šivalni materiali ostanejo v telesu oziroma jih odstranimo, če jih uporabljamo na koži. Po izvoru so **naravni** in **sintetični**. Naravni resorbilni materiali se razgradijo s pomočjo fagocitoze; ker vsebujejo beljakovine, je večja možnost reakcije tkiva, čas resorpcije pa ni predvidljiv. Sintetični resorbilni šivalni materiali se razgradijo s pomočjo hidrolize, so bolj inertni in povzročajo manj reakcij tkiv. Zelo pozitivna lastnost sintetičnih materialov je predvidljiv čas resorpcije.

Glede na sestavo delimo šivalne materiale na **enonitne** (monofilamenti) in **pletene** (polifilamenti). Monofilamentni materiali so iz enega samega nespletenega in nezvitega vlakna v zaželenih debelinah in dolžinah. Za monofilamente je značilno, da so gladke površine in zato dobro drsijo skozi tkiva in jih mehanično minimalno dražijo. So odporni proti telesnim sokovom in bakterijam. Natezna trdnost je izredno velika, raztegljivost je slaba. So krhki, upogibnost ni dobra, trdnost vozla ravno tako. Ravnanje z njimi je oteženo, ker preveč drsijo in so preveč togi.

Natezna trdnost pri polifilamentnih materialih je enakomerna po vsej dolžini. Nit je bolj raztegljiva. Površina ni čisto ravna. Drsenje skozi tkivo je zadovoljivo. S pletenjem se gibkost niti poveča, ravnanje z njo je enostavno. Slaba stran pletene niti so prostori med pletežem, kjer se lahko ugnezdiijo bakterije

in jih tam ni mogoče uničiti. Tanke niti se lahko hitro poškodujejo, tam nit oslabi, zato se je treba takim poškodbam, npr. z inštrumenti, izogibati.

Kirurške igle so le tiste igle, s katerimi uvajamo nit skozi tkiva. Razlikujejo se po obliki, velikosti in tipu konice, vse pa imajo poleg osnovne lastnosti, da pri prehodu skozi tkivo le-to čim manj poškodujejo, še druge skupne značilnosti. Vse so izdelane iz jekla različne stopnje elastičnosti. Površina igel je izdelana tako, da je pri prehodu skozi tkivo upor čim manjši. Na vsaki kirurški igli ločimo telo, uho in konico igle. Glede na vstavitev šivalnega materiala delimo igle v **travmatske** in **atravmatske**. Pri travmatskih iglah šivalni material sami vdenemo v iglo, kar pomeni večjo travmatizacijo tkiva med šivanjem, medtem ko je pri atravmatskih iglah šivalni material vdet tovarniško, bodisi z laserjem ali ročno. Od oblike konice igle sta odvisna način prodiranja igle v tkivo in stopnja poškodovanja tkiva. Večinoma uporabljamo rezilne igle za šivanje kože, za šivanje notranjih organov in tkiv pa okrogle igle z ostro konico.

LITERATURA

1. Cockshutt J. Principles of surgical asepsis. In: Slatter S, ed. Textbook of small animal surgery. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003: 149–54.
2. Fossum TW, ed. Small animal surgery. 3rd ed. St. Louis: Mosby; Elsevier, 2007: 1–158.
3. Gubina M, Dolinšek M, Škerl M. Bolnišnična higiena. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 1998.
4. Kirpensteijn J, Klein WR. Instruments. In: Kirpensteijn J, Klein WR, eds. The cutting edge. London: Roman House Publishers, 2006:30–43.
5. Mitchell SL, Berg J. Sterilization. In: Slatter S, ed. Textbook of small animal surgery. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003: 155–61.
6. Nieves MA., Wagner SD. Surgical instruments. In: Slatter S, ed. Textbook of small animal surgery. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003: 185–98.
7. Pečar J. Osnove kirurške tehnike pri poskusnih živalih. In: Štrbenc M, Frangež R, Malovrh T, Zebič A, eds. Poskusi na živalih: zakonodajni vidiki poskusov na živalih: napotki za načrtovanje dela s poskusnimi živalmi: delovno gradivo za slušatelje tečajev za delo s poskusnimi živalmi. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009: 218–25.
8. Perše M. Zakonodaja o uporabi živali v poskusih v Sloveniji. Zdrav Vestn 2006; 75: 719–25.
9. Shmon C. Assessment and preparation of the surgical patient and the operating team. In: Slatter S, ed. Textbook of small animal surgery. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003: 162–78.
10. Skubic M. Priprava programov razkuževanja za preprečevanje infekcij v zdravstveni dejavnosti. Obzor Zdrav Neg 1999; 33: 101–6.
11. Sok M. Temelji eksperimentalne kirurgije in poskusov na živalih. Ljubljana: Podvinski, 1996.
12. Ter Haar G, Klein WR. Principles of asepsis, disinfection and sterilisation. In: Kirpensteijn J, Klein WR, eds. The cutting edge. London: Roman House Publishers, 2006: 14–29.
13. Van der Velden R, van Sluijs F. Suture materials and suture techniques. In: Kirpensteijn J, Klein WR, eds. The cutting edge. London: Roman House Publishers, 2006: 54–87.

UVOD

Na področju varnosti pred biološkimi agensi, zlasti tistimi, s katerimi delamo v laboratoriju, obstajajo različne definicije pojma (WHO, OIE, FAO) in različne klasifikacije nivojev, zahtev in navodil (nacionalni nivo, združenje veterinarskih biovarnostnikov – International Veterinary Biosafety Group). Za razumevanje področja je potrebno poznati osnovno terminologijo. Kadar govorimo o biovarnosti (biosafety), mislimo na varnostne nivoje pri delu v diagnostičnem ali raziskovalnem laboratoriju. Z izrazom biološka zaščita (biosecurity) pa označujemo varnost laboratorijskih delavcev med delom in varnost živali pred okužbo v neposredni bližini laboratorija v primeru laboratorijskih nesreč. Termin biološka zaščita je novejši in se uporablja tudi v sklopu bioterorizma. Skupaj z angleškimi izrazi „biosafety“ in „biosecurity“ se uporabljajo tudi angleški izrazi „(bio)containment“, kar razumemo kot obvladovanje ali varovanje vsebine in pogojev v laboratoriju (npr. preprečevanje kontaminacije iz laboratorija, kjer delamo z živim virusom) pred zunanostjo, ter izraz „isolation“, kar razumemo kot izolacijo ali varovanje laboratorijskih pogojev in režima dela (npr. ohranjanje sterilnih pogojev v laboratoriju za celično kulturo) pred zunanjimi vplivi.

BIOLOŠKA ZAŠČITA (BIOSECURITY)

Pod pojmom biološka zaščita običajno razumemo preventivne ukrepe za zmanjšanje biološke nevarnosti, ki preti bodisi državi, regiji, reji, posamezni živali ali ljudem. Ljudje in živali so potencialno izpostavljeni različnim biološkim dejavnikom, ki lahko pridejo v državo iz tujine, bodisi z mednarodnim transportom, trgovino, turizmom, divjimi živalmi (predvsem pticami) ali kot posledica bioterorizma. Številni dejavniki pa so stalno prisotni v državi, vendar ob upoštevanju varnostnih ukrepov ne bi smeli predstavljati večje nevarnosti. Zelo pomemben vidik zagotavljanja biološke zaščite, še posebej po 11. septembru 2001, so ukrepi v laboratorijih, ki opravljajo diagnostiko nevarnih kužnih bolezni oz. mikroorganizmov.

UKREPI NA RAVNI DRŽAVE

Država mora zagotoviti nadzor na svojih mejah in letališčih, da se prepreči vnos zelo nevarnih bioloških dejavnikov. Prav tako mora imeti izdelane načrte, kot so načrt zaščite in reševanja ob množičnem pojavu kužnih bolezni pri živalih, regijski načrti in načrti ob izbruhih posameznih bolezni. Pri izvajanju ukrepov morajo sodelovati različne službe (carina, policija, vojska, civilna zaščita, veterina, medicina), katerih delo mora biti koordinirano. Posebno skrb pa je potrebno nameniti tudi obveščanju javnosti.

BIOTERORIZEM

Biološko orožje zaradi svoje dostopnosti, nizke cene, relativno preproste proizvodnje in distribucije ter nenazadnje v začetni fazi prikritega delovanja predstavlja morda največjo grožnjo državam, ki niso neposredno vpletene v vojaške spopade. Pri tem ne smemo pozabiti, da se lahko ljudje z biološkimi agensi okužijo v tujini, do izbruha bolezni pa pride šele po njihovi vrnitvi v domovino. Vsak izbruh (povečano število primerov bolezni v primerjavi s pričakovanim številom v določenem časovnem obdobju, pri čemer so primeri med seboj povezani glede na epidemiološke, toksikološke, mikrobiološke ali radiološke značilnosti) oziroma nenavaden primer bolezni pri ljudeh in živalih je potrebno podrobno preučiti tudi z vidika možnega terorističnega napada. Izdelani morajo biti načrti

ukrepov ob bioterorističnem napadu in uvedena stalna pripravljenost ekip, ki bi v primeru napada ukrepale.

UKREPI V REJAH

Nadzor nad vnosom živali v rejo (certifikati, karantene), nadzor nad gibanjem živali (stik z divjimi in drugimi domačimi živalmi), izvajanje preventivnih cepljenj in podobnih ukrepov, ukrepi v primeru obiska sejmov ali razstav, sistem reje ...

UKREPI V LABORATORIJIH

Nekatere države imajo izdelane liste organizmov in njihovih strupov, nad katerimi je potreben še poseben nadzor. V ZDA imajo tako pod posebnim režimom 81 bioloških agensov, za katerih posedovanje morajo imeti ustanove posebno registracijo. Ustanove morajo poskrbeti, da bioloških agensov nihče ne bi mogel odtujiti. Poleg tega morajo imeti pripravljene ukrepe, ki bi preprečili ali vsaj močno omejili morebitno uhajanje bioloških agensov iz ustanov v primeru nesreč (požar, potres, poplava ...) oziroma tehničnih pomanjkljivosti (izpad elektrike, izliv vode ...).

KLASIFIKACIJA MIKROORGANIZMOV

WHO razlikuje štiri skupine mikroorganizmov glede na nevarnost okužbe človeka in živali pri delu z njimi.

Skupina 1

Mikroorganizmi, ki zelo redko povzročijo bolezni pri človeku ali živalih.

Skupina 2

Mikroorganizmi, ki povzročajo bolezni pri človeku in živalih, vendar ne predstavljajo večje nevarnosti za delavce, ki delajo z njimi, niti ne za okolico. Laboratorijska okužba povzroča resna obolenja, dostopni so preventivni ukrepi in zdravljenje, verjetnost širjenja je majhna.

Skupina 3

Mikroorganizmi, ki običajno povzročajo težka obolenja pri človeku in živalih, vendar se širijo srednje ali redko z okuženega osebk na zdravega. Dostopni so preventivni ukrepi in zdravljenje, verjetnost širjenja je majhna.

Skupina 4

Mikroorganizmi, ki običajno povzročajo težka obolenja pri človeku in živalih ter se lahko neposredno ali posredno širijo z okuženih osebkov na neokužene. Najpogosteje niso dostopni preventivni ukrepi in zdravljenje, zato je verjetnost širjenja okužbe velika.

Klasifikacija mikroorganizmov v veterinarski medicini (DEFRA) – iz. angl. Department for Environment Food and Rural Affairs

Preglednica 1. Preglednica virusov. SAPO (Specified Animal Pathogen Order).

SAPO skupina 2	SAPO skupina 4
Virus Aujeszkijske bolezni	Virus afriške prašičje kuge
Virus EGL	Virus AI
Virus HBK	Konjski morbilivirus
	Virus SIP
SAPO skupina 3	Newcastle virus
Virus konjske kuge	Virus goveje kuge
Virus BT	Virus kuge malih prežvekovalcev
Virus KPK	Virus goveje kuge
Virus vzhodnega in zahodnega konjskega encefalitisa	Virus VBP
Virus IAK	Virus tešinske bolezni
Virus japonskega encefalitisa	SAPO skupina 4+ (Steklina)
Lumpy skin virus	Virus stekline in vsi virusi rodov Lyssa
Virus mrzlice doline Rift	
Virus ovčjih in kozjih koz	
Virus venezuelskega encefalitisa konj	
Virus vezikularnega stomatitisa	

KLASIFIKACIJA LABORATORIJEV

Mednarodni znak za biološko nevarnost:



Laboratorije glede na stopnjo biovarnosti razdelimo v štiri skupine:

NIVO 1 (biosafety level 1 – BSL 1)

Osnovni nivo laboratorijev, ki se uporablja v izobraževalne in v določenih primerih tudi v raziskovalne namene, ima vhod označen z mednarodnim znakom biološka nevarnost, vstop je dovoljen le pooblaščenim osebam, otrokom je vstop prepovedan, vnos laboratorijskih živali in delo z njimi morata biti avtorizirana, predpisana je osebna zaščita osebja (obutev, halje, rokavice, zaščitna očala, razkuževanje rok). Izhod v laboratorijski obleki je prepovedan, skladiščenje hrane in hranjenje v laboratoriju je prepovedano. Oprema in delovne površine v laboratoriju se razkužujejo, preprečen mora biti vstop insektom.

NIVO 2 (biosafety level 2 – BSL 2)

Laboratorij je nadgradnja nivoja 1, sem štejemo laboratorije za opravljanje javnega zdravstva, klinične laboratorije in laboratorije v bolnišnicah. Postopki, ki proizvajajo aerosole, se izvajajo v bioloških varnostnih kabinetih, potencialno biološko nevarne snovi se odlagajo ločeno od ostalih odpadkov.

NIVO 3 (biosafety level 3 – BSL 3)

Ti laboratoriji se uporabljajo za delo z mikroorganizmi iz skupine 3 ali iz skupine 2, če so v visokih koncentracijah. Takšni laboratoriji morajo biti registrirani na nacionalnem nivoju. Laboratorij je nadgradnja laboratorija varnostne stopnje 2. Pri delu se uporablja respiratorna zaščita, manipuliranje z vzorci se opravlja v varnostnih kabinetih, lokacija laboratorija mora biti izven javnega dostopa, vhod v laboratorij je preko predprostora, laboratorij se mora po potrebi hermetično zapreti, imeti mora poseben oplesk sten, zaprta okna, urejena je umetna ventilacija, zračni tlak v laboratoriju je manjši kot v okolici (podtlak), zrak se ne sme mešati z zrakom drugih laboratorijev, izhod zraka je filtriran, odpadni material se avtoklavira, v vodovodne inštalacije mora biti vgrajen sistem preprečevanja povratnega toka tekočin.

NIVO 4 (biosafety level 4 – BSL 4)

Laboratorij predstavlja nadgradnjo laboratorija stopnje 3. V laboratorijih BSL 4 se opravlja delo z mikroorganizmi iz skupine 4. Laboratorij ima vgrajene nekatere tehnične posebnosti, da se lahko izvajajo zahtevani pogoji (podtlak, možnost dekontaminacije prostorov, vhod v laboratorij preko tušev, sterilizacija vseh odplak in odpadkov iz laboratorija). V takšnih laboratorijih se ob tehnični dodelavi lahko izvaja delo tudi z maksimalno osebno zaščito, v t. i. »skafandrih«.

ODGOVORNA OSEBA ZA BIOVARNOST

Ustanova imenuje odgovorno osebo za biovarnost »biosafety officer«, ki mora zagotavljati, da se pravila, predpisi in programi v laboratoriju izvajajo. Oseba izvaja svoje aktivnosti po pooblastilu vodje inštitucije ali laboratorija. Odgovorna oseba ima pooblastila za predloge in revizije, poleg tega odobrava specifične aktivnosti, povezane z biovarnostjo. Oseba mora posedovati znanje tehnične, mikrobiološke, biokemične, fizikalne in biološke smeri, močno zaželeno pa so tudi izkušnje na področju laboratorijskega in kliničnega dela ter inženirstva.

ZAKLJUČEK

Področje biovarnosti zahteva uporabo znanj različnih področij ter zapoveduje upoštevanje različnih nacionalnih in mednarodnih predpisov ter priporočil. Biovarnost je torej heterogeno področje, kjer se morajo nenehno dograjevati znanje in tudi tehnološke rešitve. Veterinarska medicina v Sloveniji na tem področju ne zaostaja v primerjavi s svetom, saj v Sloveniji Nacionalni veterinarski inštitut razpolaga z dograjenimi laboratorijskimi zmogljivostmi na nivoju BSL 3.

LITERATURA

1. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4th ed. Washington: Centers for Disease Control, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services U.S.A., 1999.
2. Institute for Animal Health. Introduction and laboratory presentation on 10th International Veterinary Biosafety Workshop. Uppsala, Sweden: National Veterinary Institute, 2005.
3. Mani P, Langevin P, International Veterinary Biosafety Working Group. Veterinary containment facilities, design and construction handbook, 2006.
4. World Health Organization (2003): Laboratory biosafety manual. 2nd ed. Geneva: WHO, 2003.
5. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd ed. Geneva: WHO, 2004.

UVOD

Medicinske in biološke raziskave potekajo vsaj na eni od naslednjih kategorij:

- zdravi prostovoljci;
- poskusne živali;
- embrii, organi, tkiva, celice rastlinskega, živalskega ali humanega izvora;
- bakterije, glive, praživali;
- simulacija – računalniški programi, fizikalni ali kemijski produkti.

Skozi zgodovino so poskusne živali uporabljali za pridobivanje znanj o zgradbi in funkciji živali, predvsem pa za razumevanje zgradbe in funkcije človeškega organizma. Večina osnovnega znanja o humani biokemiji, fiziologiji, endokrinologiji, imunologiji in farmakologiji je pridobljena iz poskusov, ki so bili opravljeni na različnih živalskih modelih, prav tako tudi poznavanje različnih bolezni. V novejšem času je večina laboratorijskih živalskih modelov namenjena raziskovanju vzroka, poteka in zdravljenja človeških bolezni.

Znanost o laboratorijskih živalih je definirana kot znanost o znanstveni, etični in pravni uporabi laboratorijskih živalih v biomedicinskih poskusih in tako pokriva multidisciplinarno področje, ki zajema biološke in patološke specifičnosti za optimalno uporabo živali kot modelov za človeka oz. drugih živalskih vrst. Temeljna znanost o laboratorijskih živalih se ukvarja s kvaliteto živali kot čutečih orodij v biomedicinskih raziskavah. Vključuje primerjalno biologijo laboratorijskih živali, tehnične aspekte vzreje, nastanitve, vzdrževanja, anestezije, evtanazije in eksperimentalnih postopkov. Znanost o laboratorijskih živalih je specializirano veterinarsko področje, ki se ukvarja z diagnozo, zdravljenjem in preventivo bolezni pri živalih, ki se uporabljajo v biomedicinskih raziskavah. Visokokakovostne živali in visokokakovostna skrb za laboratorijske živali so predpogoj za kvalitetno opravljanje poskusov (kvalitetno znanost) in tudi sprejemanje uporabe laboratorijskih živali v biomedicinskih raziskavah v javnosti.

ŽIVALSKI MODELI

Živalski model lahko opredelimo kot živi objekt, ki posnema stanje pri ljudeh (ali drugih vrstah) in se uporablja za raziskovanje bioloških in patoloških fenomenov. Laboratorijski živalski modeli torej omogočajo opis biološkega fenomena (procesa), ki je skupen živalskemu modelu in tarčni vrsti, ki je največkrat človek. Živalske modele največkrat uporabljamo za raziskovanje humane biologije in patologije. Vrednost modelov temelji na ekstrapolaciji rezultatov iz živalske vrste na človeka, zato je znanje o primerjalni anatomiji in fiziologiji med različnimi vrstami zelo pomembno. Živalski modeli so najrazličnejše vrste v živalskem kraljestvu in so lahko glede na človeka na katerikoli evlucijski stopnji. Pomembno je, da se da z njimi opisati biološke procese pri človeku. Tak primer je npr. *Drosophyla*, na kateri so bile narejene temeljne raziskave o bazični genetiki.

VRSTE ŽIVALSKIH MODELOV

V biomedicinskih raziskavah se uporabljajo različni živalski modeli. Delimo jih na:

- raziskovalne (angl. exploratory),
- pojasnjevalne (angl. explanatory) in
- napovedovalne (angl. predictive).

Pri **raziskovalnih živalskih modelih** raziskujemo temeljne biološke mehanizme ali mehanizme, ki so povezani s kakšnim bolezenskim stanjem. **Pojasnjevalni modeli** so načrtno razviti za pojasnjevanje kompleksnejših bioloških problemov. Za pojasnjevalne modele ni nujno, da temeljijo na uporabi živali, lahko so tudi fizikalni ali matematični modeli. **Napovedovalne modele** uporabljamo za odkrivanje in ovrednotenje različnih zdravljenj. Testiramo uspešnost zdravljenja in njegovo toksičnost.

Stopnja podobnosti biološke strukture pri živalskih modelih z ustrezno strukturo pri človeku je definirana kot natančnost – verodostojnost. Visoko verodostojni modeli, ki so zelo podobni človeku, imajo prednost predvsem pri napovedovalnih modelih.

Poleg tega lahko živalske modele opredelimo kot **homologne**, kadar so simptomi, ki jih razvije žival, in potek bolezni (oziroma stanje) enaki kot pri ljudeh. Taki modeli so relativno zelo redki, primeri za to so v nevroznanosti. **Izomorfni** modeli so tisti, kjer so simptomi podobni pri živali in človeku, razlikujejo pa se po vzroku nastanka simptomov. Največ modelov pa ni niti homolognih niti izomorfnih, zato jih lahko poimenujemo »**delni**«. Ti modeli ne posnemajo celotne bolezni, ampak se uporabljajo za proučevanje določenega vidika bolezni, na primer zdravljenja (npr. inducirani mišji tumorski modeli).

Pri raziskavah, ki so usmerjene k raziskovanju vzrokov, poteka in zdravljenja različnih humanih bolezni, lahko živalske modele razdelimo v pet skupin.

Inducirani modeli

Za inducirane modele je značilno, da je bolezen ali motnja (okvara) pri živalih povzročena eksperimentalno. Na primer alergije na kravje mleko preko imunizacije z majhnimi količinami proteina ali regeneracija jeter z delno hepatektomijo. Večina induciranih modelov je izomorfni ali delni, ker je etiologija bolezni, ki je eksperimentalno povzročena pri živalih, pogosto drugačna od odgovarjajoče pri ljudeh.

Spontani modeli

Ko se bolezni, ki jih želimo preučevati, na primer zaradi določenih dednih napak, pri živalih pojavljajo spontano, dobimo spontani model. Takih modelov je zelo veliko in so shranjeni v različnih celičnih oziroma tkivnih bankah po svetu. Večinoma so spontani modeli miši in podgane. Ena izmed zelo znanih je gola miš (angl. nude mouse), katere pojav je bil prelomnica v raziskavah humanih tumorjev in je omogočila tudi prvi opis naravne celice ubijalke. Gole miši imajo namreč recesivno avtosomno mutacijo, ki se odraža v izgubi timusa in s tem T limfocitov. Leta 1969 so na gole miši prvič uspeli presaditi humani tumor in s tem odprli vrata raziskavam na humanih tumorjih, gojenih na laboratorijskih miših.

Transgeni bolezenski modeli

Z razvojem genetskega inženiringa in manipulacije embriov so transgeni bolezenski modeli postali zelo pomembna kategorija živalskih modelov. Največ transgenih bolezenskih modelov predstavljajo miši. Zaradi vstavitve določenega gena ali njegovega izbitja pa vzreja, nastanitev in vzdrževanje teh živali včasih predstavljajo zelo veliko težavo zaradi nepredvidljivosti funkcij določenega proteina v razvoju živali. Poleg tega imajo številne naše bolezni poligenski vzrok, kar zahteva še dodaten razvoj raziskav na področju transgenih živali. Del teh je že zaključen s poznavanjem genoma človeka in miši, kar bo skupaj z raziskavami na področju genomike in proteomike pokazalo, kateri so ključni geni pri posameznih boleznih, in s tem omogočilo razvoj novih homolognih živalskih modelov. Ta razvoj bo morda pomenil spremembo v živalskih modelih – od teh, kjer določujemo gene, ki so vpleteni v določeno bolezen, do tistih, kjer bomo raziskovali učinke sprememb v genskih poteh, interakcijah med geni in interakcijah med geni in okoljem.

Negativni modeli

Negativni modeli so tisti modeli, pri katerih se določena bolezen ne pojavi oziroma so živali nedojemljive za določeni dražljaj. Tak primer je na primer gonokokna infekcija pri kuncih.

»Sirote«

Sirote so modeli, s katerimi preučujemo določeno bolezen, ki se spontano pojavi pri določeni živalski vrsti, ni pa še opisana pri ljudeh. Uporabni so takrat, ko se podobna bolezen pojavi tudi pri ljudeh. Tak primer je goveji spongiformni encefalitis (prionska bolezen pri ljudeh) in virus mačje levkemije (AIDS pri ljudeh).

EKSTRAPOLACIJA IZ ŽIVALI NA ČLOVEKA

Ko pridobimo rezultate na živalskem modelu, jih moramo validirati glede na tarčno vrsto, ki je največkrat človek. Pojem ekstrapolacija uporabljamo za opis, kako natančno podatki, ki smo jih pridobili na živalskem modelu, veljajo za človeka. **Ekstrapolacija** rezultatov temelji na homologiji med vrstami. **Homologija** temelji na evolucijski podobnosti med vrstami (morfološki in fiziološki). Ekstrapolacija je kvantitativna in kvalitativna. **Kvalitativna** ekstrapolacija obravnava patofiziološke procese ali odgovore na določene dražljaje, ki jih ekstrapoliramo iz različnih živalskih modelov na človeka. **Kvantitativna** pa vključuje določevanje doze določenega produkta za ljudi ali tarčne živalske vrste na osnovi podatkov, pridobljenih na živalskih modelih.

Pri ekstrapolaciji rezultatov se je potrebno zavedati omejitev. Ena od teh je različen metabolizem oziroma različna dovzetnost različnih živalskih vrst na določena zdravila. Ljudje na primer običajno dobro prenašajo penicilin, medtem ko je za morske prašičke smrten. Aspirin je teratogen za mačke, pse, morske prašičke, podgane, miši in opice, ne pa za noseče ženske. Poseben primer je tudi talidomid, ki je povzročil malformacije pri okoli 10.000 otrocih, medtem ko malformacij pri živalih niso opazili.

Kritično vlogo pri ekstrapolaciji rezultatov ima tudi velikost organizma. Sesalci imajo precej podobno relativno težo organov oziroma podobno velikost organov glede na telesno velikost (npr. srce predstavlja 5–6 g/kg telesne teže, kri predstavlja 7 odstotkov telesne teže). Znano pa je, da imajo mali sesalci precej hitrejši metabolizem. Da dosežejo enako preskrbljenost tkiv s kisikom, je njihov srčni utrip hitrejši kot pri človeku. Kadar želimo določiti ekvivalentno koncentracijo določenega zdravila v določenem organu in v določenem časovnem obdobju glede na človeka, moramo torej upoštevati hitrost metabolizma posamezne živali. Hitrost metabolizma, ki je izražena v porabi kisika v mililitrih na gram telesne teže na uro, je s telesno težo povezana z naslednjo enačbo: $M = 3,8 \times BW^{-0,25}$, kjer je M hitrost metabolizma, BW pa telesna teža.

Na osnovi te enačbe lahko izračunamo ekvivalentne odmerke za različne živali glede na odmerek pri ljudeh, tako da je $D_1/D_2 = BW_1^{-0,25}/BW_2^{-0,25}$, torej je $D_1 = D_2 \times BW_1^{-0,25}/BW_2^{-0,25}$, kjer je D_1 znani odmerek pri ljudeh, D_2 pa ekvivalenten odmerek za živalski model. Pri živalih, katerih telesna teža je pod 100 g, je potrebno vzeti $BW^{-0,5}$. Pri preračunavanju odmerkov pa se je seveda potrebno zavedati že prej omenjenih omejitev.

IZBIRA ŽIVALKEGA MODELA

Izbira živalskega modela temelji na velikemu številu dejavnikov, povezanih s hipotezo, ki jo želimo testirati, ter tudi na praktičnih vidikih, povezanih s projektom, osebjem in opremo.

Koraki pri izbiri živalskega modela, s katerim želimo na najpreprostejši način odgovoriti na zastavljeni znanstveni problem, so:

- opredelitev problema;
- odločitev glede »ključnega substrata« (npr. celica, organ, cel organizem);
- določitev živalskih modelov, ki imajo »ključni substrat«;
- določitev, kateri živalski model ima največ prednosti glede na tehnični postopek in bo povzročil najmanj nelagodnosti živali;
- praktičnost glede na dostopnost, nastanitev, nego, opremo ipd.

Izbira živalskega modela mora temeljiti na osnovi znanstvenega praktičnega in etičnega načela in mora biti v skladu z vso veljavno zakonodajo.

PODROČJA UPORABE ŽIVALSKIH MODELOV

Živalski modeli se uporabljajo na vseh biomedicinskih področjih, ki vključujejo temeljne biološke raziskave, npr. embriologijo, ter predvsem raziskave na področju različnih bolezni. V nadaljevanju bo podrobneje predstavljena uporaba živalskih modelov v onkologiji.

UPORABA ŽIVALSKIH MODELOV V ONKOLOGIJI

Uporaba laboratorijskih živali ima velik pomen na področju raziskovanja raka. V zadnjih štirih desetletjih je postala vse bolj razvita in učinkovita. Uporaba laboratorijskih živali v onkologiji poteka v raziskavah na področjih kancerogeneze (ugotavljanje bioloških mehanizmov, ki vodijo v nastanek raka), ugotavljanju potencialnih karcinogenov v okolju in testiranju novih terapij na eksperimentalnih tumorskih modelih, ki bi vodile v ozdravitev ali kontrolo maligne bolezni pri ljudeh in živalih. Kljub razvoju mnogih *in vitro* testov ter molekularnih in biokemičnih testov so pred začetkom kliničnih študij poskusi na živalih še vedno potrebni. Te študije obsegajo potrditev aktivnosti terapije na določenem tumorskem modelu, omogočajo vpogled v metabolizem zdravila in njegovo toksičnost za normalna tkiva ter služijo kot osnova za določitev maksimalnega tolerantnega odmerka v kliničnem poskusu faze I.

Pravilen izbor poskusnega modela je zelo pomemben glede na specifičnost raziskovalnega področja. Model opredelimo glede na njegovo uporabnost, selektivnost, napovedno vrednost in ponovljivost. Poleg tega so pomembni tudi genetska stabilnost in heterogenost celične linije, ki jo presajamo, imunogenost in biološki končni izid (angl. endpoint), ki ga uporabljamo za oceno uspešnosti zdravljenja (lokalna rast, metastaze, preživetje). Glede na raznolikost raziskav v eksperimentalni onkologiji in s tem tudi raznolikost živalskih in tumorskih modelov je splošna navodila o dobrem počutju živali v eksperimentalni onkologiji zelo težko postaviti.

Vrste živalskih modelov v onkologiji

V eksperimentalni onkologiji uporabljamo različne tipe živali: standardne inbridirane imunsko odzivne, imunsko zavrte gole (disgeneza timusa), SCID (okvara popravljalnih mehanizmov DNA) in transgene živali. Večinoma se v eksperimentalni onkologiji uporabljajo glodavci, najpogosteje miši. Vsak tip živali ima kot modelni organizem za raziskave o raku določene prednosti in tudi slabosti.

Inbridirane imunsko odzivne živali so najbolj razširjene v raziskovalnih laboratorijih. Najbolj znane standardne inbridirane linije miši so C57BL/6, BALB/c, DBA in CBA, obstaja pa še vrsta drugih. Njihovo gojenje ne predstavlja težav, zato so relativno poceni. Tudi njihovo vzdrževanje ni zahtevno z vidika zagotavljanja sterilnih pogojev. Poleg naštetih prednosti pa obstaja tudi veliko eksperimentalnih mišjih tumorskih modelov, ki jih lahko presadimo v imunsko odzivne miši in na njih izvajamo poskuse. Njihova glavna slabost je prav to, da izvajamo poskuse na presajenih mišjih tumorjih, ki v mnogih dejavnikih ne odražajo realne klinične situacije.

Gole miši pogosto uporabljamo v poskusih zaradi njihovega okrnjenega imunskega sistema, ki omogoča, da lahko vanje presajamo določene vrste humanih tumorjev. Vendar pa je pri delu z njimi potrebno uporabljati strogo sterilne pogoje, da preprečimo nastanek infekcij. Prav njihov še deloma delujoči imunski sistem (ohranjena funkcija B limfocitov in nespecifične imunosti) pa predstavlja njihovo glavno pomanjkljivost pri testiranju uspešnosti terapij, saj poleg testirane terapije na protitumorsko učinkovitost deluje tudi preostali imunski sistem. SCID miši imajo še bolj okvarjen imunski sistem in so zato še bolj primerne za gojenje humanih tumorskih modelov.

Transgene in »knockout« miši se vedno pogosteje uporabljajo v raziskavah o vplivu posameznih genov (predvsem onkogenov in tumorskih supresorskih genov) na razvoj, napredovanje ali zdravljenje raka. Kadar delamo z gensko spremenjenimi organizmi (predvsem kadar vnašamo humani genetski material v živali, npr. genska terapija), moramo slediti vsem zahtevam in navodilom glede zaščite pri delu z gensko spremenjenimi organizmi. To vključuje uporabo zaščitne opreme za osebe, uporabo zaščitnih komor ne samo v času poskusa, ampak tudi pri oskrbi živali, pravilno odstranjevanje odpadkov (tudi stelje) in čiščenje opreme.

Tumorski modeli

Tumorski model je skupno ime za vse spontane tumorje, ki izrastejo v laboratorijskih živalih, in tudi t. i. presajene tumorje, ki jih vzgojimo v laboratorijskih živalih z vbrizganjem tumorskih celic ali presaditvijo delčka tumorja na določeno mesto v laboratorijsko žival.

Tumorski modeli so presajeni tumorji, tumorji zgodnjih generacij, dobro opisani tumorji (trajne celične linije) in ksenografti humanih tumorjev. Zelo pomembno je, da pred načrtovanjem poskusa dobro poznamo biološke značilnosti tumorskega modela, saj lahko samo tako izvedemo primeren test. Incidenca tumorjev, njihova rast in izrast ter narava stranskih učinkov so odvisni od metode, s katero induciramo tumorje, biologije tumorja in kateri organski sistemi gostitelja so v to vključeni. Tumorji so lahko čvrsti in lokalno omejeni, čvrsti, ki tvorijo metastaze, lahko rastejo kot ascites (kot posamezne celice v trebušni votlini, kjer se potem tvori ascitesna tekočina), lahko so to krvni raki, raki kostnega mozga in limfomi. Tumorje lahko presajamo na različne lokacije, najbolj običajno mesto je v podkožje, lahko pa jih presajamo tudi na ortotopna mesta.

Prednosti spontanih tumorjev glodavcev so, da zelo natančno posnemajo humane tumorje glede na antigensko sestavo, hitrost rasti in stopnjo diferenciacije. Glavna slabost pa je ta, da jih je relativno malo, so slabo opredeljeni in je zato težko načrtovati poskuse in teste za ovrednotenje učinka terapij. Tumorji zgodnjih generacij imajo večinoma še vedno karakteristike originalnega tumorja, vendar pa sta načrtovanje in izvedba poskusa zaradi večjega števila tumorjev, ki jih dosežemo s presaditvijo, že lažja. Glavna prednost trajnih celičnih linij, s katerimi induciramo tumorje v poskusnih živalih, je, da so ti tumorji dobro opredeljeni, reproducibilni in da imamo na voljo številne različne teste, s katerimi ovrednotimo učinke terapij.

Najboljši model pa so humani tumorski ksenografti, kjer humane tumorske celice presadimo v živali z okrnjenim imunskim sistemom. Ti tumorji zadržijo biološke in morfološke lastnosti originalnega tumorja, slabost pa je to, da so tumorske žile in njihova anatomija specifične za gostitelja in ne za tumor.

Posebnosti pri delu s poskusnimi živalmi v onkologiji

Poskusne živali v onkologiji, predvsem v raziskavah, ki poleg gojenja tumorja vključujejo tudi različne vrste zdravljenja (kirurgija, obsevanje, aplikacija različnih učinkovin), so podvržene še dodatnemu stresu in bolečini. Razvoj in rast tumorjev (spontan, induciran ali presajen) zahtevata posebno opazovanje, spremljanje in skrb za živali, predvsem takrat, ko pride do razvoja bolezni. Pri določenih lokacijah tumorja sledenje razvoja bolezni ni težko (npr. čvrsti podkožni tumorji ali ascitesni tumorji), pri tistih, kjer pa je to težje (humani ksenografti levkemij ali limfomov, čvrsti tumorji notranjih organov), pa je potrebno slediti kliničnim znakom, kot so izgubljanje teže, anemija, apatija in oteženo dihanje.

Poleg naštetega pa je za dobro počutje živali pri razvoju in rasti tumorjev potrebno biti pozoren tudi na naslednje:

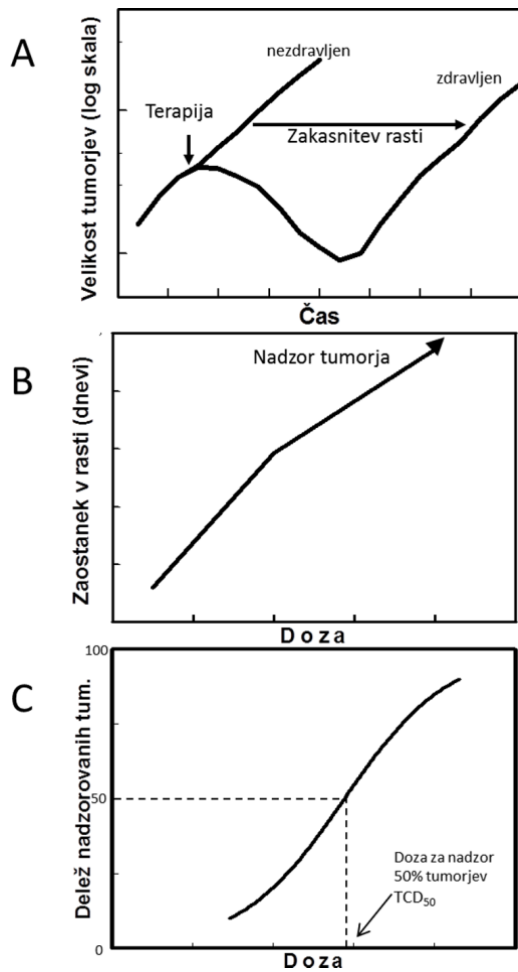
- razširjenost oziroma raztezanje tumorja. Če tumor na primer raste na taki lokaciji, da pritiska na okoliško normalno tkivo (npr. v mišici), lahko to dodatno obremenjuje žival oziroma predstavlja težavo zanjo;
- paraneoplastični sindrom. Razvoj tumorja je lahko povezan z motnjami v fizioloških in metabolnih procesih. Kaheksija je eno najbolj očitnih stanj in je povezana z energetskim neravnovesjem, ki vodi v izgubo teže in mišic. Pri raziskavah kaheksije je 30-odstotna izguba teže znak, da zaključimo poskus in žival humano žrtvujemo;
- ulceracija (gnojenje) tkiv, ki ležijo nad tumorjem, se lahko pojavi pri tumorjih, presajenih v podkožje ali v kožo. Poskus pri takih tumorjih naj bi bil načrtovan tako, da je cilj poskusa dosežen, preden tumor ulcerira, saj so lastnosti ulceriranega tumorja spremenjene, predvsem glede hitrosti rasti. Poleg tega pa lahko preko ulcerirane površine pride tudi do izgube telesnih tekočin, tkivne nekroze in infekcije. Če je potrebno, da živali z ulceriranimi tumorji vzdržujemo, moramo zagotoviti še dodatno oskrbo in spremljanje;
- smrtnost. Nekatere tumorske celične linije zaradi velike hitrosti rasti zelo hitro ubijejo gostitelja. Pri poskusih s takimi tumorskimi celičnimi linijami (npr. mišja levkemija L1210) moramo izbirati primerne teste, pri katerih se poskus zaključi, preden živali postanejo umirajoče ali začno umirati;
- veliki tumorji. Glodavci običajno dobro prenašajo velike površinske (podkožne) tumorje, tudi do 10 odstotkov njihove teže (npr. 2–3 g velik tumor pri miši). Vendar pa je zaželeno, da se postavijo meje glede velikosti, ki so povezane s premerom tumorja in ne s težo tumorja glede na težo živali. Kadar rast tumorja omejuje živali neovirano gibanje ali krmljenje in pitje vode, je potrebno poskuse zaključiti v fazah, ko to gibanje še ni omejeno.

Zaradi specifičnosti raziskav v onkologiji je potrebno posebno pozornost posvetiti dobremu počutju laboratorijskih živalih. Vestno je potrebno spremljati vse znake, ki kažejo na počutje živali. Znaki, kot so izguba telesne teže, dehidracija, anoreksija, hipotermija in apatija, kažejo na to, da je žival na robu smrti (angl. life threatening situation). Znaki, kot so izguba telesne teže, zgrbljena drža in razmršena dlaka, kažejo na to, da se žival ne počuti dobro, ne povedo pa, kako resno je stanje živali. Zato je potrebno iskati in izboljšati načine spremljanja stanja živali v poskusu.

Načelo 3R je potrebno upoštevati pri vseh raziskavah. Posebno pozornost moramo posvetiti načrtovanju poskusov (pilotne študije, nasvet statistika, učenje dela z živalmi in pravilna dokumentacija), napovedovanju in prepoznavanju stranskih učinkov, določevanju stopnje bolečine in stresa, poznavanju biologije tumorjev, čim bolj humanemu izboru postopkov, stalnemu pregledovanju živali, dokumentaciji in objavljanju.

Testi za ovrednotenje uspešnosti terapij

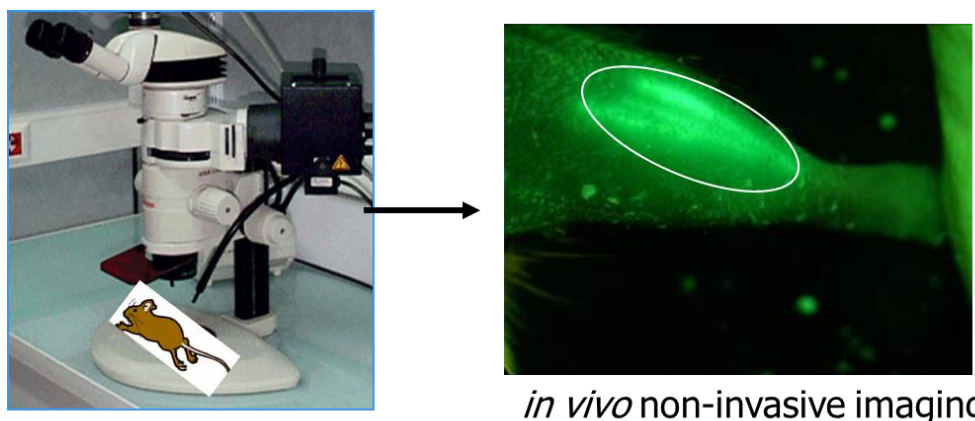
Za določevanje protitumorskega delovanja različnih vrst zdravljenj uporabljamo teste, kot so test klonogenosti, test zaostanka rasti, test lokalne kontrole tumorjev, uporaba določenih biomarkerjev. S testom klonogenosti merimo sposobnost delitve oz. preživetja posameznih tumorskih celic, kar pomeni, da so te celice ohranile reprodukcijsko integriteto. Pri vrednotenju učinka terapij na čvrste tumorje pa se uporabljata predvsem test zaostanka rasti in lokalna kontrola tumorjev (Slika 1). Bolj pomembna kot absolutna občutljivost tumorskih celic na določeno zdravljenje pa je relativna občutljivost v primerjavi z občutljivostjo normalnih tkiv, t. i. terapevtski indeks.



Slika 1: Testi za ovrednotenje učinka terapij na čvrstih tumorjih. A. Velikost kontrolnih in zdravljenih tumorjev merimo v odvisnosti od časa in tako lahko izrišemo rastno krivuljo. B. Razliko med hitrostjo rasti kontrolnih tumorjev in zdravljenih tumorjev opredelimo kot zaostanek v rasti, ki je izražen v dnevih v odvisnosti od odmerka. Daljši ko je zaostanek v rasti, bolj uspešna je terapija. C. Kadar je terapija tako uspešna, da vodi v ozdravitve tumorjev, govorimo o lokalni kontroli tumorjev.

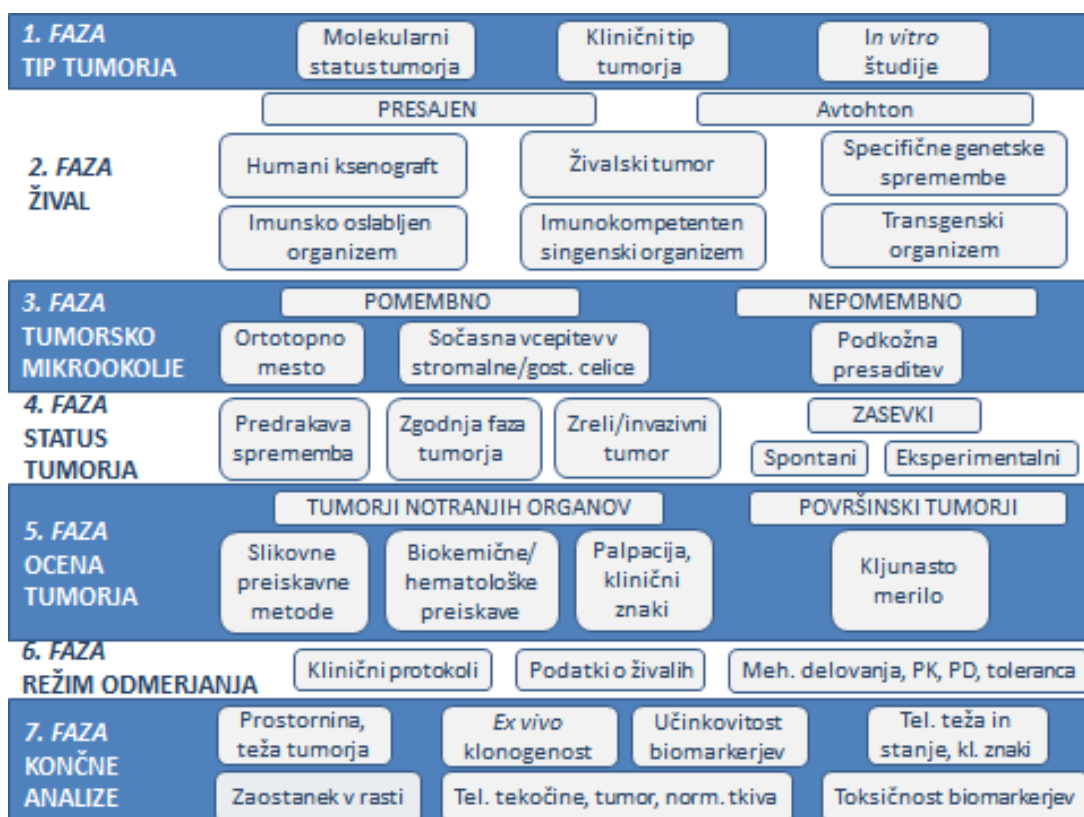
Teste, s katerimi ovrednotimo občutljivost normalnih tkiv, delimo na teste klonogenosti in teste, ki ovrednotijo funkcijo tkiv in organov. Teste klonogenosti lahko izvajamo na koži, črevesni sluznici, ledvicah, vranici in drugih organih. Med funkcionalne teste pa spadajo število vdihov (pljučna kapaciteta), izločanje EDTA za opredelitev funkcije ledvic in krvni testi za določevanje toksičnosti za kostni mozeg.

Razvoj novih metodologij spremljanja različnih fluorescenčnih označevalcev ali luminiscence z zelo občutljivimi kamerami in mikroskopi (*in vivo* imaging) pa je v *in vivo* pogojih na celi živali omogočil spremljanje različnih fizioloških procesov ter spremljanje in določevanje učinkovitosti terapij (Slika 2). Te metode pomenijo velik napredek pri zmanjševanju števila živali v poskusu, ker lahko spremembe na isti živali merimo oz. opazujemo v času, s čimer močno zmanjšamo variabilnost poskusa, po drugi strani pa je potrebno biti zelo pozoren na zdravstveno stanje živali, predvsem zaradi ponavljajočih anestezij.



Slika 2: Primer uporabe fluorescenčnega stereo mikroskopa za neinvazivno spremljanje ekspresije reporterskega proteina – »zeleno fluorescirajočega proteina« v mišici pri miši – po genskem elektroprenosu. Tak neinvaziven način omogoča spremljanje učinka postopka v času pri isti živali, s čimer zmanjšamo število živali v poskusu in biološko variabilnost.

V začetku opisane teoretične osnove za izbor živalskega modela in v primeru znanstvenoraziskovalnih poskusov v onkologiji tudi tumorskega modela so na sliki 3 predstavljene za primer testiranja onkološkega zdravljenja z zdravilom. Slika 3 predstavlja ilustrativen primer, kako izbrati primeren tumorski in živalski model in njegovo uporabo na primeru testiranja določenega zdravila. V tem primeru moramo na vsaki stopnji preučiti naštetе dejavnike, preden gremo na naslednjo stopnjo. Tako se moramo najprej odločiti za primeren tumorski model z znanim molekularnim profilom in narejenimi *in vitro* študijami. Naslednja faza je izbor laboratorijske živali in pomembnost tumorskega mikrookolja. Ostale faze so namenjene določevanju uspešnosti terapije glede na mesto tumorja in predvideno analizo.



Slika 3: Primer procesa odločanja o izboru živalskega in tumorskega modela za določevanje učinka terapije (prirejeno po Workman et al, 2010).

LITERATURA

1. AAALAC's Reference Resources (Association for assessment and accreditation of laboratory animal care international). <http://www.aaalac.org/accreditation/resources.cfm>.
2. Hau J, Poulsen OM. Doses for laboratory animals based on metabolic rate. *Scand J Lab Anim Sci* 1988; 15: 81.
3. Hau J. Animal models. In: Hau J, Van Hoosier GL, eds. *Handbook of laboratory animal science. Volume II: animal models*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003: 1–9.
4. Hendriksen CFM, Morton DB, eds. *Humane endpoints in animal experiments in biomedical research: proceedings of the International conference, 22-25 Nov. 1998, Zeist, The Netherlands*. London: Royal Society of Medicine Press, 1999.
5. Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumor to »nude« mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77: 758–60.
6. Schmidt-Nielsen K. *How animals work?* London: Cambridge University Press, 1972.
7. UKCCCR Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. 2nd ed. London: United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, 1997.
8. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010; 102: 1555–77.

V Evropski uniji v znanstvene namene letno uporabimo okoli 12 milijonov poskusnih živali (COM 2007 – 675). V Sloveniji smo v letu 2007 po podatkih Veterinarske uprave RS porabili 12.334 poskusnih živali, če štejemo samo vretenčarje. Direktiva 2010/63/EU, ki je prišla v veljavo novembra 2010 (revidirana Direktiva 86/609/EGS), določa smernice za zmanjšanje števila poskusnih živali z uporabo alternativnih metod. Države članice morajo do 10. novembra 2012 sprejeti in objaviti zakone ter predpise, potrebne za uskladitev z direktivo. Predpisi začnejo veljati s 1. januarjem 2013.

Da bi omogočili zahteve direktive, je potrebno zagotoviti razvoj alternativnih metod. Trenutno znanje in izkušnje nam napoved nevarnih lastnosti neke snovi z dovolj veliko gotovostjo samo na podlagi alternativnih metod omogoča le v omejenem številu primerov. O načelih humanih eksperimentalnih tehnik sta v svoji knjigi že leta 1959 pisala Burch in Russell (Russell in Burch, 1959). Načela, poznana kot 3R načela, zajemajo zmanjšanje števila poskusnih živali (Reduction), izboljšanje poskusov v smislu večje zaščite živali (Refinement) in nadomestitev poskusov na živalih z *in vitro* in *in silico* metodami (Replacement).

Zahteve po večji zaščiti živali imajo velik vpliv na zakonodajo, ki določa kemijsko varnost industrijskih kemikalij, biocidov, fitofarmaceutskih sredstev, veterinarskih in humanih zdravil ter kozmetičnih izdelkov. Posebej stroge zahteve in časovne roke je določal 7. amandma Direktive 76/768/EEC (Direktiva 2003/15/ES), ki ureja področje kozmetičnih izdelkov in predvideva ukinitve poskusov na živalih za kozmetične izdelke in prepoved trgovanja s kozmetičnimi izdelki in sestavinami, ki so bile testirane na živalih, v Evropski skupnosti. Nova Uredba 1223/2009/EU o kozmetičnih proizvodih naj bi celotno vsebino sicer poenostavila, določbe o prepovedi testiranja na živalih bodo ostale nespremenjene.

Postavljeni roki so bili sledeči: rok za prepoved testiranja za kozmetične izdelke je 11. september 2004, testiranje sestavin pa bo prepovedano postopno, odvisno od uradne potrditve alternativnih metod, vendar v vsakem primeru najkasneje do 11. marca 2009; prepoved trgovanja s takimi izdelki naj bi začela veljati 11. marca 2009; to velja za izdelke, s katerimi so bili izvedeni testi za vse učinke, pomembne za zdravje človeka, razen za določanje strupenosti z večkratnimi odmerki, določanje nevarnosti za razmnoževanje in za študije toksikokinetike; za te specifične učinke je rok 4 leta daljši, in sicer 11. marec 2013.

Velik izziv za pospešen razvoj alternativnih metod predstavlja tudi kemijska uredba REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) (Uredba 2006/1907/EC). V sklopu te zakonodaje je potrebno pridobiti nove toksikološke podatke za 30.000 kemikalij, kar pomeni povečanje uporabe poskusnih živali. Zakonodaja sicer določa, da se predvsem za manjše tržne količine kemikalij v glavnem uporabljajo alternativne metode.

Zanimivo je, da so sprejemljive tudi metode, ki še niso validirane in uradno potrjene. Prioriteta in zahteve za testiranje naraščajo z naraščajočo količino kemikalije (>1 t/leto, >10 t/leto, >100 t/leto, >1.000 t/leto) in v skladu z že znanimi nevarnimi lastnostmi teh snovi (npr. rakotvornost, mutagenost, nevarnost za razmnoževanje, obstojnost v okolju).

Leta 1991 je Evropska komisija ustanovila Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), katerega namen je promocija razvoja, validacija in ugotavljanje sprejemljivosti alternativnih pristopov. ECVAM tesno sodeluje z drugimi sorodnimi ustanovami, ki delujejo v svetu, kot sta ameriški in japonski center za alternativne metode (ICCVAM, JaCVAM) ter OECD organizacija, ki koordinira proces potrditve testnih metod na globalni ravni. ECVAM sprejema pobude s strani

raziskovalcev, ki predlagajo nove alternative, koordinira proces validacije alternativnih metod in preko svetovalnega organa ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) podaja mnenje o določeni metodi ter vodi bazo podatkov o alternativnih metodah. Ta zajema povzetke metod oziroma testnih sistemov na podlagi pregleda literature, INVITTOX protokole, ocene predlaganih študij in formalno validirane študije, poleg tega pa tudi zbirko snovi in rezultatov opravljenih testov z metodami, ki so vsebovane v bazi. ECVAM je tudi stičišče za izmenjavo informacij o osebah in institucijah, ki delujejo na področju alternativnih metod. TSAR (Tracking System for Alternative test methods Review, Validation in the Context of EU Regulation on Chemicals) sistem omogoča sledenje statusa alternativnih metod od predloga novega protokola do validacije in potrditve oziroma sprejema v zakonodajo. Številne druge alternativne metode se že uporabljajo v fazi testiranja (presejalni testi) pred začetkom glavnega poskusa in v postopku testnih strategij.

Preglednica 1: Seznam sprejetih metod in metod v postopku ocenjevanja, objavljen na spletni strani TSAR 6. junija 2011.

	Sprejete metode	Metode v postopku
Korozivnost kože	TER, EpiSkin™	CORROSITEX
Draženje kože	EpiSkin™, Original EpiDerm™, Modified EpiDerm, SkinEthic	-
Draženje oči	LVET	BCOP, ICE, RRET, IRE, HET_CAM, FL
Preobčutljivost v stiku s kožo	LLNA	rLLNA
Mutagenost	-	Micronucleus
Akutna strupenost	FDP, ATC	Up and down, Acute Inhalation Toxicity, ATC Inhalation
Strupenost pri več odmerkih	-	-
Strupenost za razmnoževanje	EST, MM, WET	-
Drugo	3T3NRU Phototoxicity, Skin absorption, STTA for Eds	-
Akutna strupenost za ribe	FTA	-

Test, ki v celoti nadomesti *in vivo* metodo, je na primer test določanja dražilnosti ob stiku s kožo. Dražilnost za kožo smo do sedaj določali s testom na kuncih, po postopku, ki je opisan v smernicah OECD 404 oziroma C.1 (Direktiva 67/548/EGS, Aneks V). Draženje kože je navadno opredeljeno kot pojav reverzibilnih vnetnih sprememb v koži. Ker je vloga systemskega odgovora pri lokalnem draženju kože majhna, je možnost za napoved dražilnih lastnosti neke snovi na podlagi *in vitro* sistema toliko večja, seveda pod pogojem, da je testni sistem dovolj podoben človeški koži. Namen *in vitro* testa je napovedati dražilne lastnosti testne snovi za potrebe razvrščanja in označevanja nevarnih snovi v EU. Dražilne snovi so razvrščene kot nevarne in označene s stavkom R38 Draži kožo (Direktiva 67/548/EGS, Aneks VI). Novost na tem področju je Uredba 1272/2008/ES o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi Direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006, ki nadomešča staro zakonodajo in uveljavlja mednarodno sprejeta pravila GHS – globalnega sistema harmonizacije.

Obstajajo različni *in vitro* modeli, med njimi človeška koža, koža podgane in laboratorijsko pripravljene modeli kože, kot je na primer EpiDerm™. Princip metode sloni na ugotavljanju živosti celic modela kože po izpostavitvi testni snovi. Stanje celic ugotavljamo z MTT testom, ugotavljamo dehidrogenazno spremembo MMT molekul v formazan sol, ki se obarva modro. Količino formazan soli določimo po ekstrakciji iz tkiva. Zmanjšanje živosti tkiva, ki je bilo izpostavljeno testni snovi, v primerjavi z negativno kontrolo je merilo za potencialno možnost, da bo snov povzročila draženje kože. Dodatno se lahko meri tudi količina sproščenega interleukina IL-1 α , vendar je MTT test ocenjen kot bolj uporaben. Raziskovalci so s poskusi pokazali, da *in vivo* testi na kuncih napovedo dražilne lastnosti za več snovi kot *in vitro* testi, ki so se izkazali kot boljša napoved dejanske dražilnosti za človeka. Od 13 testnih snovi, ki so bile dražilne v *in vivo* sistemu, je bilo 9 dražilnih v *in vitro* sistemu, od teh pa so bile le 3 dražilne za človeka. *In vitro* modeli, osnovani na celicah človeške kože, so torej lahko bolj uporabni za napovedovanje nevarnosti za človeka kot pa testi na živalih (Bendová s sod., 2007).

Nekatere alternativne metode testov na živalih ne nadomestijo popolnoma, temveč omogočijo uporabo manjšega števila živali ter zmanjšajo stres in bolečine živali med poskusom. Primer je test preobčutljivosti na miškah, t. i. test na lokalnem limfnem vozlu/bezgavki (Local Lymph Node Assay – LLNA), ki omogoči uporabo manjšega števila testnih živali. Test temelji na oceni imunskega odziva, ki ga sproži stik s kemikalijo v fazi senzitizacije. Ne zahteva pa se faza izziva reakcije preobčutljivosti. Test torej v veliki meri zmanjša stres za poskusne živali. Pomanjkljivost tega testa je, da sicer še vedno ne napove pravilno potenciala za povzročanje preobčutljivosti v primeru nekaterih kovin in nekaterih dražilnih snovi.

Najbolj klasičen toksikološki test je akutni oralni test, s katerim določamo srednji smrtni odmerek, ki povzroči smrtnost polovice testnih živali (LD 50) pri enkratnem odmerku (OECD 401, 1987). Smernice so predpisovale uporabo 10 živali v skupini, 10 odmerkov za oba spola živali, torej skupno 200 živali. Test je v osnovni obliki prepovedan od leta 2002 in nadomeščen s tremi alternativnimi metodami: metodo fiksnega odmerka, metodo toksikološkega razreda in metodo iskanja smrtnega odmerka navzgor in navzdol, ki še ni dokončno sprejeta. Ideja alternativnih metod za določanje akutne oralne strupenosti je, da uporabimo minimalno število živali, da določimo kategorijo strupenosti za potrebe razvrščanja in označevanja. Možno je izvesti tudi mejni test, kjer pri najvišjem odmerku testiramo le 5 živali v treh skupinah. Če ta odmerek nima učinka na živali, nadaljnje testiranje ni potrebno, testna snov pa ni razvrščena kot nevarna. Za tak test se navadno odločimo, ko imamo dovolj informacij, ki nakazujejo, da snov ni nevarna. Tovrstno načrtovanje testiranja je osnova za razvoj novih testnih strategij, ki so izjemno pomembne pri izvajanju REACH zakonodaje (Uredba 2006/1907/ES). Pri zbiranju informacij so pomembne fizikalno-kemijske lastnosti snovi in rezultati toksikološkega testiranja na drugih organizmih. Pomembno je poznati lastnosti snovi s podobno strukturo in strukturne značilnosti, za katere je znano, da povzročajo škodljive učinke. Raziskovanje molekularne strukture snovi in njenih lastnosti je privedlo do novega pristopa ocenjevanja nevarnosti: t. i. (Q)SAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Ta pristop omogoča, da ocenimo nevarne lastnosti neke snovi na podlagi opozorilne skupine v molekuli. Epoksi skupina v molekuli na primer kaže na potencialno možnost rakotvornih lastnosti. Lastnosti nove molekule lahko predvidimo na podlagi podobnosti z že znano molekulo (t. i. »read across« pristop). Lahko obstaja večja skupina sorodnih molekul in govorimo o kategoriji (homologe vrste). Nevarne lastnosti lahko napovemo z računalniškimi sistemi na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti in drugih podatkov. Enostaven primer je napovedovanje obstojnosti v okolju na podlagi porazdelitvenega koeficienta Kow (npr. EPIWIN). Razviti so obsežni računalniški sistemi, ki zajemajo bazo različnih parametrov večjega števila kemikalij in omogočajo napoved lastnosti novih kemikalij na podlagi znanega seta podatkov za učenje sistema (DEREK sistem za napoved preobčutljivosti in rakotvornosti). Vzporedno poteka razvoj na področju *in vitro* sistemov in študija genomike, proteomike in sorodnih smeri. Vse te posamezne alternativne metode skupaj predstavljajo baterijo testov, ki omogočajo zbiranje podatkov, uporabljenih za napovedovanje nevarnih lastnosti snovi oziroma za načrtovanje testiranja – testno strategijo.

Nova testna strategija je bila razvita na področju ekotoksikologije (Hutchinson s sod., 2003; Jeram s sod., 2005). V tem primeru se za potrebe pridobivanja informacij o nevarnosti za vodno okolje zbirajo podatki o strupenosti testne snovi za alge, vodne bolhe in ribe. Snov se razvrsti na osnovi tistega podatka, ki predstavlja največjo nevarnost. Ker izmed treh testov rezultat strupenosti na ribah le redko

doseže najnižjo vrednost, podatki tega testa pogosto niso ključni pri razvrščanju in označevanju kemikalij (Weyers s sod., 2000). Nova testna strategija torej predlaga, da se snov najprej testira z algami in vodnimi bolhami, ribe pa uporabimo le za preverjanje, ali so morda bolj občutljive na snov. To izvedemo z mejnim testom pri nižji koncentraciji LC 50 od dveh predhodno opravljenih testov (testi z algami in vodnimi bolhami). Test z ribami se v celoti izvede, le če se izkaže, da so ribe dejansko najbolj občutljive. Na ta način je po načrtovanem testiranju v sklopu nove kemijske politike REACH število uporabljenih rib možno zmanjšati do 70 odstotkov (Jeram s sod., 2005).

Uspeh razvoja alternativnih metod je v veliki meri odvisen od rezultatov študij na živalih. Žal pogosto ugotavljamo, da je variabilnost rezultatov *in vivo* študij večja, kot bi pričakovali. Primer variabilnosti akutne LC 50 vrednosti za ribe preučujemo v sklopu raziskovalnega projekta OSIRIS (Optimized Strategies for Risk Assessment of Industrial Chemicals through Integration of Non-Test and Test Information, GOCE-ET-2007-037017). Ugotovili smo, da so razpoložljive baze toksikoloških podatkov pogosto nepopolne in torej ne omogočajo kakovostne statistične obdelave podatkov, niti ne predstavljajo dobre osnove za razvoj alternativnih metod (Hrovat s sod., 2009).

Trenutno na evropski in svetovni ravni potekajo številni raziskovalni projekti, katerih cilj je razviti alternativne metode, ki bi nadomestile tudi bolj obsežne in kompleksne študije, kot je na primer testiranje razmnoževanja in razvoja zarodka ter testiranje preobčutljivosti (ReProTect, Sens-it-iv). Po drugi strani pa potekajo raziskave *in vitro* sistemov, ki bi omogočili alternativni študij posameznih segmentov. Veliko informacij s tega zelo obsežnega področja ponujajo spletne strani (npr. ECVAM, AltTox, BfR ZEBET, AXLR8).

Poleg področja toksikološkega testiranja snovi so alternativne metode pomembne tudi na področju testiranja cepiv, bazičnih bioloških in medicinskih raziskav ter pri izobraževanju. Veliko koristnih informacij o razpoložljivih modelih in alternativnih metodah je objavljenih na spletnih straneh (npr. FRAME, NCU, EURCA).

Uporaba živali v znanstvene namene še vedno ostaja nujnost za zagotavljanje varnosti za ljudi, živali in okolje. Pomembno je, da so študije pravilno načrtovane, da na podlagi ene študije pridobimo kar čim več informacij ter da so študije dovolj kakovostne, da bodo v prihodnje omogočile boljši razvoj alternativnih metod. Izredno stroga pravila so postavljena pri uporabi primatov (opic). Njihova uporaba je možna le v izjemnih primerih (SSC, 2002). Strokovnjaki opozarjajo, da je potrebno preprečiti ponavljanje študij in izvajanje poskusov, ki niso nujno potrebni.

Pomemben je učinkovit sistem objavljanja in izmenjave podatkov, preverjanja kakovosti in postavitve kakovostnih baz podatkov, da bi preprečili nepotrebno podvajanje testov in omogočili boljšo osnovo za razvoj novih alternativnih metod in testnih strategij. Evropska komisija v ta namen financira več programov. Eden od njih je AXLR8, ki zagotavlja orodja in priložnosti za večje povezovanje, izmenjavo informacij, reševanje problemov, strateško načrtovanje in sodelovanje med različnimi znanstvenimi disciplinami in interesnimi skupinami, da bi pospešil prehod na paradigmo za oceno kemijske varnosti, ki temelji na upoštevanju zaporedja toksikoloških procesov. AXLR8 deluje kot osrednja točka za usklajevanje med 3R raziskovalnimi projekti v Evropi in na mednarodni ravni.

LITERATURA

1. Alternative testing strategies progress report 2010. Replacing, reducing and refining use of animals in research. The AXLR8 Consortium, 7th Framework programme. <http://axlr8.eu>.
2. Bendová H, Basketter D, Kandárová H, Marriott M, Kejlová K, Jírová D, Spiller, Liebsch M. (2007). Comparison of human patch test and 3D human skin model results with classification of chemicals based on rabbit Draize test. 14th Congress on Alternatives to Animal Testing, September 28–30, 2007 at the University of Linz, Austria.
3. Fielder R. Acceptance of acute toxicity alternatives: the challenges ahead [Up and down method]. ATLA 1996; 24: 89.

4. Hrovat M, Segner H, Jeram S. Variability of the *in vivo* fish acute toxicity data. Aquatic toxicology. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2009; 54: 294–300.
5. Hutchinson TH, Barrett S, Buzby M, Constable D, Hartmann A, Hayes E, Huggett D, Länge R, Lillicrap AD, Straub JO, Thompson RS. A strategy to reduce the numbers of fish used in acute ecotoxicity testing of pharmaceuticals. Environ Toxicol Chem 2003; 22: 3031–3036.
6. Jeram S, Riego Sintes JM, Halder M, Baraibar Fentanes J, Sokull - Klüttgen B, Hutchinson TH. A strategy to reduce the use of fish in acute ecotoxicity testing of new chemical substances notified in the European Union. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2005; 42: 218–224.
7. Russell WM in Burch RL. Principles of Human Experimental Technique (The 3Rs). 1959. London: Methuen, 1959: 238.
8. Weyers A, Sokull-Klüttgen B, Baraibar-Fentanes J, Vollmer G. Acute toxicity data: a comprehensive comparison of results of fish, *Daphnia* and algae tests with new substances notified in the EU. Environ Toxicol Chem 2000; 19: 1931–1933.
9. COM (2007) 675. Commission Report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the Member States of the European Union.
10. ECHA (Evropska agencija za kemikalije). http://echa.europa.eu/reachit_en.asp.
11. REACH (Nova kemijska politika). http://echa.europa.eu/doc/timeline_en.pdf.
12. Uredba (REACH) 1907/2006/ES o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:SL:PDF>.
13. Uredba 1272/2008/ES o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (CLP). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:SL:PDF>.
14. Uredba 440/2008/ES o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo REACH. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:SL:PDF>.
15. Direktiva 2003/15/ES o spremembi Direktive Sveta 76/768/EGS o približevanju zakonodaje držav članic v zvezi s kozmetičnimi izdelki. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:13:31:32003L0015:SL:PDF>.
16. New cosmetic regulation to strengthen product safety and to cut red tape. IP/08/184, Brussels,
17. 5th February 2008. <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/08/184&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>.
18. The Scientific Steering Committee (SSC): »The need for non-human primates in biomedical research«, statement adopted 4–5 April 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out253_en.pdf.

Uradno potrjene testne metode:

1. OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development, Chemicals Testing Guidelines. http://www.oecd.org/departement/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html.
2. CPSQ – Consumer Products Safety and Quality unit of DG Joint Research Centre of the European Commission. <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/testing-methods>.

Alternativne metode:

1. TSAR – Tracking System for Alternative test methods Review, Validation and Approval in the Context of EU Regulations on Chemicals. <http://tsar.jrc.ec.europa.eu>.
2. ECVAM – The European Centre for the Validation of Alternative Methods of DG Joint Research Centre of the European Commission. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
3. Alternative Methods Database by ECVAM. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>.
4. Evropska komisija, Okolje, Kemikalije, Zaščita laboratorijskih živali. http://ec.europa.eu/environment/index_sl.htm.
5. NCA Netherlands Centre Alternatives to animal use. <http://www.vet.uu.nl/nca/links>.
6. European Centre for Alternatives in higher education. <http://www.eurca.org>.

V sodobni družbi je vse pomembnejša etično upravičena uporaba živali v poskusih in težnja po doslednem upoštevanju načel 3R. Že evropska direktiva o varstvu živali, ki se uporabljajo za poskusne in v druge znanstvene namene (86/609/EGS), spodbuja razvoj alternativnih pristopov, ki lahko nadomestijo, zmanjšajo ali spremenijo uporabo testov na živalih (*in vivo*) v raziskovalne in izobraževalne namene. Alternativni testi vključujejo različne računalniško podprte metodologije, na primer napovedne metode *in silico*, postopke oziroma teste *in vitro*, metodologije na podlagi toksikogenomike in druge ustrezne metodologije. Metode *in vitro* vključujejo teste na izoliranih organih in tkivih, celičnih kulturah in celičnih linijah. Kot pri vseh alternativnih metodah morajo biti tudi te metode preverjene. Leta 1992 je bil v ta namen ustanovljen Evropski center za validacijo alternativnih metod (ECVAM), ki deluje pod okriljem Inštituta za zdravje in varovanje potrošnikov (IHCP) znotraj Skupnega raziskovalnega središča (JRC) Evropske unije (<http://ecvam.jrc.it/>). Večina do zdaj potrjenih alternativnih testov temelji na uporabi celičnih kultur, zato ta prispevek opisuje tipe, pripravo in osnove vzdrževanja celic v kulturi.

CELIČNE KULTURE

Celične kulture omogočajo proučevanje izbranih tipov celic neodvisno od kompleksne zgradbe tkiva ali organa zunaj organizma. Celice so gojene v takih pogojih, da se razmnožujejo, ohranjajo svoje oblike in funkcije ter se diferencirajo. Uporaba celičnih kultur je razširjena predvsem na področjih farmacevtske in medicinske biotehnologije, v okviru katerih se uporabljajo za (i) pripravo produktov iz celic, (ii) v celičnem in tkivnem inženirstvu in (iii) pri alternativnih testih, ki nadomeščajo testiranje na živalih. Slednji vključujejo predvsem metode za validacijo in doziranje pripravkov, to je terapevtskih učinkovin in kozmetičnih izdelkov.

Tipi celičnih kultur

Ločimo tkivne kulture, kulture primarnih in sekundarnih celic in celične linije. Celične kulture se glede na pritrjenost na podlago delijo še na pritrjene (adherentne) in nepitrjene (suspenzijske). Če odvzeto tkivo ali organ oziroma del organa (na primer rezine organa, tanjše od 1 mm) vzdržujemo v ustreznih pogojih *in vitro*, ta pomeni kulturo tkiva ali organa. Kadar je ohranjena strukturna organizacija in funkcija organa, govorimo o tako imenovani organotipični kulturi. Če se celice v kulturi znova povežejo in oblikujejo tridimenzionalno strukturo, ki je podobna tkivu in posnema njegove funkcije, govorimo o histiotipični kulturi. Zamisel o vzdrževanju tkiv in organov v kulturi je bila pomembna v zgodnjem razvoju tehnik kultiviranja celic, vendar so kmalu spoznali, da je zaradi razlik v rastnem potencialu posameznih vrst celic znotraj tkiva ali organa te za daljše obdobje težko vzdrževati *in vitro*. Poleg tega za vsak poskus potrebujemo svež organ, saj se kulture tkiv in organov ne razmnožujejo *in vitro*, variabilnost med poskusi je velika in ponovljivost rezultatov slaba, zaradi tega so jih v glavnem nadomestile kulture individualnih celic.

Kulturo primarnih celic dobimo, ko celice, odvzete direktno iz tkiva, vzdržujemo v hranilnem mediju. Vendar je zaradi heterogenosti tkivnega vzorca treba tkivo predhodno obdelati, če želimo pridobiti primarno kulturo določenega celičnega tipa. Priprava kulture primarnih celic običajno vključuje te korake:

- odvzem vzorca;
- izolacijo celic (mehanično razbitje tkiva, obdelavo tkiva s proteolitičnimi encimi, kot sta tripsin in kolagenaza);
- ločevanje celic (na podlagi velikosti/premera celic, obstoja značilnih antigenov na površini celic);
- gojenje celic v pogojih *in vitro* (določitev pogojev za rast, izbira hranilnih medijev).

Ko kultura primarnih pritrjenih celic doseže konfluentnost (od 90- do 100-odstotna preraščenost dna gojilne posodice), se njihova proliferativna sposobnost zmanjša. V tej fazi celice presadimo v svež hranilni medij. Ta postopek imenujemo presaditev oziroma subkultiviranje celic. Z razmnoževanjem primarnih celic v kulturi pridobimo kulturo sekundarnih celic in z vsakim naslednjim subkultiviranjem pridobimo kulturo sekundarnih celic višje pasaže. Večina celic vretenčarjev v pogojih *in vitro* po določenem številu delitev odmre. Hayflikova limita je eksperimentalno določena meja, iz katere je mogoče razbrati, kolikokrat so se celice sposobne mitotsko deliti. Mišje in človeške celice se delijo od 30- do 50-krat, preden zaidejo v kritično obdobje in odmrejo. Občasno celice zaradi določenih genskih sprememb postanejo nesmrtnne, vendar je ta pojav redek. Te celice tvorijo netransformirane celične linije. Primer tako pridobljene celične linije so opičje ledvične epitelijske celice, imenovane BSC-1. Drugače so lahko genske spremembe za doseg nesmrtnosti celic inducirane z obsevanjem, s kemičnimi kancerogeni, tumorskimi virusi in transfekcijo z onkogeni. Kot vir celičnih linij se lahko uporabljajo tudi tumorske celice in eden najbolj znanih primerov je celična linija HeLa, pridobljena iz cervikalnega karcinoma pacientke Henriette Lacks. Vir celičnih linij so lahko prav tako matične celice. To so nespecializirane celice s sposobnostjo dolgotrajnega ohranjanja v kulturi z mitotsko delitvijo. Delo z matičnimi celicami humanega izvora ureja evropska direktiva 2004/23/ES o določitvi standardov kakovosti in varnosti, darovanja, pridobivanja, testiranja, predelave, konzerviranja, shranjevanja ter razdeljevanja človeških tkiv in celic. Iz te direktive so izvzeti kri in krvni pripravki (razen krvotvornih matičnih celic) ter človeški organi, kot tudi organi, tkiva ali celice živalskega izvora.

Prednosti uporabe celičnih kultur so nadzorovano celično okolje in možnost njegovega spreminjanja, znan tip celic, možnost pridobivanja večjih količin celic in proučevanje različnih celičnih funkcij. Omejitve oziroma slabosti uporabe celičnih kultur pa so predvsem visoki stroški, možnost okužb, zlasti pri delu s primarnimi celičnimi kulturami, zahtevnost gojenja določenih vrst celic v kulturi in izguba diferenciranega fenotipa.

Najpogostejše uporabljene celične linije so celice HEK-293 (humane embrionalne epitelijske ledvične celice, okrajšano iz angl. human embrional kidney cells; slika 1), celice CHO-K1 (ovarijske celice kitajskega hrčka, okrajšano iz angl. hamster ovary cells) in celice MDCK (celice pasjih ledvic Madin-Darby, okrajšano iz angl. Madin-Darby canine kidney). Večina celičnih linij je komercialno dostopna. Največja dobavitelja sta ameriška zbirka celičnih kultur (ATCC, American Type Culture collection) in evropska zbirka živalskih celičnih kultur (ECACC, European Collection of Animal Cell Cultures). Večina celičnih linij spada med gensko spremenjene organizme (GSO), zato delo z njimi ureja zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi. Prostori, v katerih poteka delo z GSO, morajo biti registrirani pri Ministrstvu za okolje in prostor Republike Slovenije na podlagi Pravilnika o vsebini prijave zaprtega sistema in prijave dela z GSO v zaprtem sistemu. Delo z GSO v zaprtem sistemu se lahko opravlja le v prostorih, v katerih so izpolnjeni predpisani pogoji za varnostni razred (varnostni razredi I–IV), v katerega so uvrščene celične linije. Končna uvrstitev del z GSO temelji na predhodno opravljeni oceni tveganja. V zaprtih sistemih je ocena tveganja sestavljena iz dveh delov, in sicer iz ocene tveganja, ki ga GSO pomeni za varnost in zdravje ljudi, in ocene tveganja za okolje. Ocena tveganja za zdravje ljudi se zahteva tudi v Pravilniku o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu (Uradni list RS, št. 4/02, 39/05). Različni varnostni razredi dela z GSO pomenijo uporabo različno strogih zadrževalnih ukrepov (fizičnih, kemičnih, bioloških in organizacijskih), ki preprečujejo sproščanje GSO v okolje. Na primer: celice HEK-293 spadajo med GSO, saj je v njihov genom vključena kopija dela humanega adenovirusa tipa 5. Virus je nepatogen za gostiteljske celice HEK-293 in te virusa tudi ne izločajo. Te celice so v oceni tveganja za delo z GSO v zaprtih sistemih uvrščene v varnostni razred I. Celične linije lahko uporabljamo nespremenjene ali za pripravo rekombinantnih prehodno ali trajno transfeciranih celičnih linij.



Slika 1: Prikaz celic HEK-293 na ravni svetlobne mikroskopije (obarvano s hematoksilinom in z eozinom; slikano pri 400-kratni povečavi).

PRIPRAVA REKOMBINANTNIH PREHODNO IN TRAJNO TRANSFECIRANIH CELIČNIH LINIJ

Priprava rekombinantnih celičnih linij, ki izražajo visoko raven želenih proteinov, je zelo pomembna pri načrtovanju raziskav *in vitro*. S transfekcijskimi metodami vnesemo tujo molekulo DNA v evkariontsko gostiteljsko celico. Ena najstarejših metod za vnos nukleinskih kislin v kulture sesalskih celic je metoda dietilaminoetil dekstran (DEAE-dekstran). Pri razvoju novih metod so poskušali izboljšati učinkovitost in ponovljivost transfekcij ter zmanjšati citotoksičnost. DEAE-dekstranski metodi sta sledili metoda transfekcije s kalcijevim fosfatom in elektroporacija, leta 1987 pa je bila uvedena še transfekcija z liposomi. Liposomi, ki so trenutno v uporabi, vsebujejo mešanico kationskih in nevtralnih lipidov. Nastanek transformacijskega kompleksa temelji na interakciji med pozitivno nabitim liposomom in negativno nabito DNA. Nastali kompleks, liposom DNA, preide v celico s pomočjo endocitoze. V primerjavi z DEAE-dekstransko metodo in s transfekcijo s kalcijevim fosfatom se je z uporabo liposomov povečala predvsem učinkovitost in ponovljivost transfekcij. Vendar pa je uspešnost transfekcije zelo odvisna od vrste celic. Mogoča sta dva načina vnosa proučevanega gena v gostiteljsko celico: prehodni in trajni. Pri prehodni transfekciji se molekula DNA vnese v celično jedro, vendar se ne vključi v kromosom gostiteljske celice. To pomeni, da so v celici številne kopije proučevanega gena, kar vodi do visoke ravni izraženega proteina v transfeciranih celicah. Prehodno transfecirane celice je treba analizirati od 24 do 96 ur po transfekciji. Pri trajni transfekciji se vnesena molekula DNA ali vgradi v kromosom ali pa ostane znotraj celice kot plazmid. Verjetnost integracije tuje DNA v kromosom je približno $1 : 10^4$ in je odvisna od vrste celic. Celice, ki so uspešno vgradile DNA v kromosom ali jo ohranile v obliki plazmida, lahko ločimo od ostalih (netransfeciranih) celic z uporabo selektivnih označevalcev. Najpogosteje se uporabljajo geni za odpornost na antibiotike (na primer neomicin (G418), hygromicin B), ki jih v celico vnesemo skupaj z genom, ki ga proučujemo. Pred začetkom selekcije je treba določiti učinkovito letalno koncentracijo ustreznega antibiotika za netransfecirane celice. Osamitev transfeciranih celic se najpogosteje opravi ali z votlimi cilindri za kloniranje, ali z diski (sterilni filterpapir v obliki kroga, premera 2–6 mm), ali pa z razvrščanjem s pretočnim citometrom. Temu nato sledi še karakterizacija rekombinantne trajne celične linije, s katero določimo raven izražanja vnesenega proteina in potrdimo ohranjenost njegovih funkcionalnih lastnosti.

GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Hranilni mediji

Celice gojimo v tekočih hranilnih medijih. Na voljo je več komercialno dostopnih medijev, ki so bili razviti za posamezne celične tipe. Najpogosteje se uporabljajo hranilni mediji DMEM (Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu, okrajšano iz angl. Dulbecco's modified Eagle's medium), BME (osnovni Eaglov medij, izvirno razvit za celice HeLa in mišje celice L), Hamov F12-medij in drugi. Osnovne sestavine hranilnega medija so: ogljikovi hidrati (najpogosteje glukoza), aminokisline v koncentraciji od 0,1 do 0,2 mM (izjema je glutamin, ki je dodan v koncentraciji 2–4 mM), soli in bikarbonat, ki deluje kot puferski sistem v kombinaciji s 5-odstotno koncentracijo CO₂ v inkubatorju. Poleg tega hranilni medij vsebuje še vitamine in hormone v nizkih, običajno mikromolskih koncentracijah ter indikator

fenol rdeče, ki je kazalnik vrednosti pH. Hranilnemu mediju se pred začetkom uporabe doda še serum goveda ali konja v od 2 do 10-odstotni koncentraciji. Zaradi visoke vsebnosti rastnih faktorjev se najpogosteje uporablja plodov serum goveda. Za zmanjšanje možnosti kontaminacije celičnih kultur se hranilnim medijem lahko dodajo tudi antibiotiki, na primer penicilin (100 U/ml) za zaviranje rasti po Gramu pozitivnih bakterij ter streptomycin (50 mg/ml) za zaviranje rasti številnih po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij.

Rast celičnih kultur je mogoča le v nadzorovanih pogojih okolja (temperatura, atmosfera s CO₂) in z uporabo ustreznih hranilnih medijev. Celice, pridobljene iz komercialno dostopnih virov ali izolirane iz živalskih tkiv, nasadimo z ustrezno nasaditveno gostoto (10⁴–10⁵ celic/ml hranilnega medija) v ustrezno gojitveno posodo. To omogoča rast celic do gostote približno 10⁶ celic/ml ali 10⁵ celic na cm² površine v treh oziroma štirih dneh. Adherentne celične kulture se pritrdijo na podlago v nekaj urah po nasaditvi.

Rast celic delimo na več faz:

- faza lag – zgodnja faza, v kateri ni očitnega povečanja gostote celic;
- faza rasti – v tej fazi pride do eksponentnega povečanja števila celic;
- stacionarna faza – v tej fazi se koncentracija celic ne povečuje zaradi pomanjkanja hranilnih snovi, akumulacije toksičnih presnovkov ali pomanjkanja rastne površine; slednje velja le za pritrdjene celične kulture;
- faza propada – nastopi celična smrt.

Ko celice dosežejo maksimalno koncentracijo, jih presadimo (subkultiviramo), da zagotovimo njihovo optimalno rast v svežem hranilnem mediju. Pri suspenzijskih celičnih kulturah subkultiviranje vključuje samo razredčitev celic v svežem hranilnem mediju. Subkultiviranje adherentnih celičnih kultur pa vključuje odlepljenje celic s podlage (na primer z 0,25-odstotno raztopino tripsina z dodatkom 0,3-odstotne etilendiaminotetraoetne kisline (EDTA)) in vcepitev ustreznega števila celic v svež hranilni medij. Trajno lahko celice zamrzujemo v kompleksnem mediju ali serumu z dodatkom od 8 do 10-odstotnega DMSO pri –80 °C, hranimo jih v tekočem N₂ pri –196 °C.

Oprema laboratorija in sistem dela

Laboratorij za delo s celičnimi kulturami mora omogočati sterilno delo in minimalen pretok ljudi. Osnovna oprema laboratorija vključuje komoro z laminarnim pretokom zraka, inkubator CO₂, invertni mikroskop, centrifugo, hladilnik z zamrzovalnikom, mehanske pipete in umivalni pult (slika 2). Za gojenje celic in delo z njimi se uporablja plastični potrošni material za enkratno uporabo (pipete, nastavki, petrijevke, epruvete in podobno). Pri delu s celicami je obvezna uporaba osebne zaščitne opreme (halja, rokavice), pri odtajanju celic tudi zaščitna maska. Pipetiranje se izvaja samo z avtomatskimi pipetami. Površine v komori z laminarnim pretokom zraka se pred uporabo in po njej dezinficirajo s 70-odstotnim etanolom. Pri delu z določenimi tipi celic se priporoča preventivno cepljenje (Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu (Uradni list RS, št. 4/02, 39/05)).

Ravnanje z odpadki

Pri delu s celičnimi kulturami nastajajo trdi in tekoči odpadki. Trdi odpadki so plastični potrošni material za enkratno uporabo (pipete, nastavki, petrijevke, platenke za gojenje celic, epruvete in drug pribor). Tekoči odpadki so hranilni mediji za gojenje celic in ostale raztopine, ki se uporabljajo pri delu s celičnimi kulturami. Neodvisno od utečenega postopka odstranjevanja odpadkov v laboratoriju je treba vse trdne odpadke, ki nastajajo pri delu s celičnimi kulturami, odlagati v ustrezne posode za avtoklaviranje. Steklovino in drug pribor vsaj eno uro dekontaminiramo z namakanjem v razkužilu (1-odstotna vodna raztopina virkona S ali 2,5-odstotna vodna raztopina varikine), preden gredo v običajen proces pranja.



Slika 2: Oprema v laboratoriju za celične kulture na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

LITERATURA

1. Butler M. Animal cell culture and technology. London: Garland Science/Bios Scientific Publisher, 2004. (The Basics)
2. Direktiva 86/609/EGS o varstvu živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene.
3. Direktiva 2004/23/ES o določitvi standardov kakovosti in varnosti, darovanja, pridobivanja, testiranja, predelave, konzerviranja, shranjevanja in razdeljevanja človeških tkiv in celic.
4. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO) Uradni List RS 2002; 12 (67): 7635 (z dne 26. 7. 2002)
5. Zakona o spremembah in dopolnitvah Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO-B) Ur List RS 2010; 20 (21): 2658 (z dne 15. 3. 2010)
6. Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu Ur List RS 2002; 12 (4): 358. (z dne 18. 1. 2002)
7. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu. Uradni List RS 2005; 15 (39): 3769. (z dne 19. 4. 2005)

UVOD

Znanstvenoraziskovalno delo delimo v temeljno (bazično), uporabno (aplikativno) in razvojno (inovacijsko). Poleg osnovnih principov raziskovanja je pri raziskovalnem delu, ki vključuje uporabo živali, treba upoštevati še dodatne zahteve, s katerimi ste se seznanili na tem tečaju in so vam bile predstavljene v posameznih predavanjih. S pomočjo pridobljenega znanja študijo z živalmi načrtujemo in izvajamo, na koncu pa tudi interpretiramo rezultate, ki smo jih dobili v določenem času, na določenem kraju, na določeni živali, pod določenimi pogoji. Torej v našem laboratoriju, z našo ekipo izvajalcev in z uporabo čisto določenih merilnih naprav. Zavedati se moramo, da na naš postopek ne smejo vplivati naključni dejavniki. Tudi rezultati ne smejo biti naključni, ne smejo biti le enkratni dogodek. Da bo naša študija uspešno izvedena, potrebujemo dober načrt študije.

Oporne točke pri izvajanju in izvedbi so vam lahko:

- oblikovanje hipoteze ali natančna določitev cilja
- preverjanje hipoteze ali iskanje in kritično ovrednotenje zbrane literature
- načrtovanje raziskovanja (načrt študije)
- izvajanje raziskovanja (preskusni sistemi, metode in instrumenti)
- obdelava in interpretacija rezultatov, (zaključno poročilo študije)
- arhiviranje zapisov, trajnih vzorcev, načrta in poročila študije
- objava v obliki članka ali monografije

IZRAZI

Študija pomeni eksperiment ali vrsto eksperimentov, v katerih se raziskuje izbrane parametre s pomočjo izbranega preskusnega sistema in izbrane metode z namenom, da se v kontroliranih pogojih pridobi zanesljive in ponovljive rezultate.

Preskusni sistem pomeni vsak biološki, kemijski ali fizikalni sistem ali njihovo kombinacijo, ki se uporablja v študiji.

Načrt študije je dokument, ki opredeljuje cilje, preskusni sistem in metode za pridobitev rezultatov.

Vodja študije je oseba, ki je odgovorna za pravilno izvedbo študije in za pravilno ravnanje z živalmi.

Osebe v študiji (izvajalci posameznih postopkov ali meritev ter oskrbniki živali) so osebe, ki izvajajo posamezne dodeljene postopke skladno z načrtom študije.

Neobdelani podatki so vsi izvirni laboratorijski zapisi, ki so rezultat izvirnih opažanj ali meritev.

NAČRTOVANJE ŠTUDIJE

1. Hipoteza ali natančna določitev cilja študije

Definicija problema in oblikovanje hipoteze je delo vsakega raziskovalca na katerem koli področju znanosti. Preverjanje smiselnosti in ter empirično preverjanje hipoteze naše zamisli pa je zelo pomembno, naporno in dolgotrajno delo.

2. Preverjanje hipoteze ali iskanje in kritično ovrednotenje zbrane literature

Pri vseh raziskavah, tudi pri tistih, ki vključujejo živali, je zelo pomembno, da pred načrtovanjem poskusa veliko časa posvetimo iskanju ustrezne literature po različnih bazah podatkov in poskušamo dobiti čim več podatkov in raziskav s področja, ki ga želimo preveriti. Na ta način dobimo znanje o že uveljavljenih metodah, o alternativnih metodah, o že izvedenih študijah in o že objavljenih rezultatih. Skratka seznanimo se z že obstoječimi dejstvi in se izognemo uvajanju ali ponavljanju že znanega. Za oceno kvalitete literaturnih podatkov je vedno potreben zelo kritičen pristop. Priporočljivo je upoštevati pravila po Klimischu.

Pravila na podlagi točkovanika razvrstijo objavljene članke v 4 kategorije:

1. uporaben brez omejitev (ima dobro definirane vse postavke)
2. uporaben z omejitvami (uporaben je samo tisti del, ki je dobro definiran)
3. nezanesljiv (rezultati so vprašljivi zaradi slabo definiranih metod)
4. neuporaben (ni izvirni članek, ni opisa lastne metode in lastnih rezultatov)

V kolikor smo preverili in pretehtali vse možnosti in ugotovili, da hipoteze brez uporabe živali ne bo mogoče preveriti, se lotimo načrtovanja naše raziskave. V načrtu študije vedno navedemo argumente, zaradi katerih uporaba alternativnih metod ni bila možna.

NAČRT ŠTUDIJE

Načrt študije je zelo natančen dokument, ki dokazuje, da imamo znanje, da vemo kaj bomo delali, in da smo se zadeve lotili resno. Napisan mora biti pred začetkom študije (!).

Vsi sodelujoči morajo biti seznanjeni s celotnim načrtom in prevzeti odgovornost za svoje delne zadolžitve.

Med samim izvajanjem so možne dopolnitve ali spremembe, ki se zabeležijo v pisni obliki in se vnesejo v končno poročilo študije.

Načrt študije je sestavljen iz naslednjih točk (Koliko podtočk vključite vanj pa je odvisno predvsem od teme, ki jo želite raziskati).

1. Splošni podatki o študiji

- naslov študije
- identifikacijska oznaka študije
- ime in naslov preskuševalnega laboratorija
- ime vodje študije
- imena izvajalcev študije in osebja vključenega v delo z živalmi
- datumi: datum odobritve načrta študije, datum začetka in dokončanja študije ter datum začetka in konca dela z živalmi.

2. Opredelitev cilja in namena študije

Na kratko opišemo namen študije in pričakovane cilje. Navedemo argumente, zaradi katerih uporaba alternativnih metod ni možna. Opišemo kriterije, na osnovi katerih je bila izbrana živalska vrsta ali model. Utemeljimo zanesljivost in ponovljivost metod.

3. Opis preskusnega sistema (v našem primeru so to živali!)

Za dober opis živali, ki smo jih izbrali, in pogojev, v katerih bomo izvajali poskus, potrebujemo naslednje točke:

a) Utemeljitev izbire preskusnega sistema pripravimo:

- glede na fiziološke in anatomske značilnosti
- ali je mikrobiološki status živali pomemben za naše rezultate
- ali je genetski status pomemben za naše rezultate
- ali potrebujemo določen spol
- ali potrebujemo posebne pogoje okolja
- ali moramo narediti predposkus pred samim glavnim poskusom

b) Opišemo lastnosti izbranega preskusnega sistema (npr. vrsta živali, število, starost, telesna teža, spol, izvor, posebne lastnosti,...).

c) Določimo potrebno število živali:

- glede na variabilnost v literaturi opisanih podatkov si pomagamo s statističnimi metodami za določitev velikosti potrebnega vzorca (skupine). Pri tem lahko uporabimo rezultate iz literature ali iz svojih predposkusov.

d) Opišemo označevanje živali, kletk, skupin.

e) Opišemo izbor in razporeditev živali v skupine, število skupin. Možnosti:

Kontrolne skupine:

- negativna, nam pokaže vplive okolja in našega dela z živalmi na normalne fiziološke parametre
- v pozitivni, znano metodo ali znano substanco primerjamo z novo testno

Poskusne ali tretirane skupine (tudi testne):

- na njih preskušamo novo metodo ali novo substanco in nimamo predhodno znanih rezultatov.

Poskrbimo za:

- zapis o zdravstvenem stanju živali ob naselitvi
- prehrano in oskrbo z vodo
- nastanitev živali, dnevno oskrbo in aklimatizacijo
- okoljske parametre (temperatura, vlaga, menjava zraka v kletkah ali sobi)
- osvetlitev / tema (običajno 12 svetlih ur/12 teme)

4. Opis preskusnih metod, preskušanca, postopkov in merilnih instrumentov

V študiji kot metodo lahko uporabimo:

- priznana že validirano metodo (OECD metode)
- metodo, ki je natančno opisana v strokovni literaturi
- ali zelo natančno opišemo svojo novo metodo in validacijo metode

Na žalost pa postopka ali dela postopka, ki se izvede na živali, ni možno validirati. Prav zato je pomemben natančen opis postopka. Namesto tega se uporabljajo predposkusi in statistični modeli. Vse tiste dele študije, ki so izvedeni na merilnih instrumentih, se da validirati.

4.1 Opredelitev metode

- predklinična (npr. farmakološka učinkovitost, toksičnost, varnost ...)
- klinična (npr. testiranje zdravila za veterinarsko uporabo ...)
- raziskovalna (uvajanje nove metode, testiranje različnih metod, testiranje fizikalnih faktorjev ...)

4.2 Opredelitev preskušanca

Preskušanec je lahko snov s farmakološkim učinkom

- določimo testno in referenčno učinkovino
- določimo nosilec, koncentracijo in volumen odmerkov
- določimo način aplikacije
- določimo število aplikacij

Preskušanec je lahko kirurški postopek

- opišemo znano kirurško metodo in novo metodo, ki jo želimo preskusiti.
Preskušanci so različni drugi fizikalni ali kemični naravnih ali izzvani vplivi na organizem:
- opišemo znane načine preskušanja in novo metodo, ki jo želimo preskusiti.

4.3 Postopki in merilni instrumenti

Določimo spremenljivke, ki jih želimo meriti, ter opišemo postopek merjenja in merilni instrument.

Meritve izvedemo na živi živali, na odvzetem vzorcu tkiva ali na usmrčeni živali. Vedno ovrednotimo in opišemo predvideno nelagodje, stres ali bolečino za žival. Če je potrebno, navedemo tudi sredstvo, s katerim želimo zmanjšati bolečino.

Najpogostejše preiskave in spremenljivke, ki jih merimo:

- klinična preiskava (opazovanje obnašanja, funkcijskih sposobnosti, odstopov od normalnega ...)
- merjenje fizioloških parametrov (temperatura, EKG ...)
- merjenje telesne teže (prirast), porabe hrane in vode
- hematološka preiskava (hemogram, diferencialna krvna slika, strjevalni čas ...)
- biokemična preiskava (encimi, glukoza, Na, Ca, trigliceridi ...)

- urinska analiza
- analiza cerebrospinalne tekočine
- imunološka preiskava (pt, faktorji, markerji ...)
- mikrobiološka, parazitološka, virološka preiskava
- analitska preiskava (določanje koncentracije v tkivih, časa izločanja ...)
- patoanatomska preiskava

Obvezna je navedba načina usmrtnitve živali in uporabljene substance.

Seznam in točkovalnik makroskopskih sprememb, ki jih želimo kvalitetno in kvantitetno določati ob raztelesbi, morata biti pripravljena vnaprej.

Prav tako pripravimo seznam organov, ki jih bomo odvzeli in/ali tehtali, seznam organov in tkiv, ki jih bomo ob raztelesbi odvzeli za histološko in druge preiskave, ter način shranjevanja ali fiksiranja odvzetih tkiv in organov, ki bodo uporabljeni v različnih meritvah.

- histološka preiskava

Opišemo postopek za pripravo histološkega preparata in navedemo uporabljena barvila. Opišemo instrument, na katerem bomo opravili meritve (vrsta mikroskopa).

Pripravimo seznam mikroskopskih sprememb, ki jih želimo kvalitetno in kvantitetno določiti s histološko preiskavo (naprej določen točkovalnik histoloških sprememb).

- in tudi vse druge preiskave

5. Rezultati opazovanj in meritev

Rezultati meritev in opazovanj so zapisani v različnih oblikah: številčni zapis, opis z gradacijo, grafični zapis, fotografija in drugo.

- Rezultate zapisujemo na vnaprej pripravljene delovne liste.
- Osnovni rezultat je meritev ali opazovanje, opravljeno na eni živali ali enem vzorcu.
- Rezultate uredimo po izbranih skupinah, po časovnih točkah, po posameznih parametrih.
- Oblika mora biti primerna za statistično obdelavo.

6. Statistična obdelava podatkov

Izberemo statistično metodo/program, ki nam omogoči željeno analizo podatkov. Obvezno navedemo ime statističnega programa. Opišemo, katere spremenljivke bomo ovrednotili, kako jih bomo med seboj primerjali in kakšen zaključek želimo (signifikantnost, medsebojno odvisnost ...).

6.1 Predstavitev podatkov

Zapišemo, v kakšni obliki bomo predstavili posamezne vrste podatkov (preglednice, grafikoni ...). Zapišemo tudi, kje v poročilu študije bodo zbrani osnovni podatki in kje statistično obdelani.

ZAKLJUČNO POROČILO ŠTUDIJE

Zaključno poročilo je sestavljen dokument, ki poleg načrta študije vsebuje tudi pridobljene osnovne podatke ter rezultate po statistični obdelavi.

Prvi del je prepis načrta študije z opisom vseh sprememb, dodatkov ali opustitev, ki so se zgodile med samo študijo, in pregled vseh osnovnih neobdelanih podatkov, ki so bili pridobljeni med študijo v obliki, primerni za statistično analizo (preglednice).

Drugi del je prikaz statistično obdelanih rezultatov (povprečja, preglednice, grafikoni) ter prikaz rezultatov statistične analize in ovrednotenje dobljenih rezultatov (signifikantnost, odvisnost, razpršenost, natančnost).

Zaključno poročilo študije mora biti datirano, podpisano s strani vodje študije in shranjeno skupaj z vsemi osnovnimi podatki, trajnimi vzorci in drugim materialom iz študije.

ZAKLJUČNA MISEL

Dober načrt študije, dosledno izvajanje načrta z dobro ekipo strokovnjakov zagotavlja obilico rezultatov, ki so uporabni, ponovljivi in neovrgljivi. Ob vsem tem pa se lahko pohvalimo, da smo dobro ravnali z živalmi, da smo jih uporabili najmanj in da poskusov ne bo treba ponavljati.

PRIPOROČENA LITERATURA

Poleg EU konvencije, EU direktive in slovenske zakonodaje lahko preberete še:

1. van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science: revised edition: a contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. 2nd rev. ed. Amsterdam: Elsevier, 2001.
2. OECD metode <http://www.oecd.org/>.
3. FELASA priporočila <http://www.felasa.eu/recommendations>
4. Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. A systemic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. Regul Toxicol Pharmacol 1997; 25: 1–5.
5. Kališnik M, Zabavnik Piano J, Rožić A. Temelji znanstvenoraziskovalne metodologije v biomedicini. Ljubljana: UL, Medicinska fakulteta, 2006.
6. Perše M, ed. Poskusne živali: skrb za živali in kvalitetne raziskave. Ljubljana: UL, Medicinska fakulteta, 2010.

ZDRAVSTVENA TVEGANJA PRI DELU Z LABORATORIJSKIMI ŽIVALMI

KAJ JE OCENA TVEGANJA

Zakon o varnosti in zdravju pri delu določa ukrepe za zagotavljanje varnosti in zdravja pri delu. Pojem varnosti in zdravja pri delu že po svoji vsebini in namenu obsega pravice in obveznosti delodajalcev in delavcev, da v skladu z zakonom in drugimi predpisi ter ob določanju in upoštevanju varnostnih ukrepov, s katerimi se obvladujejo oziroma preprečujejo nevarnosti in škodljivosti pri delu, zagotavljajo takšno raven varnosti in zdravja pri delu, ki glede na naravo dela zagotavlja delavcu največjo možno mero zdravstvene in psihofizične varnosti.

Temelj varnosti in zdravja pri delu je vnaprej preprečiti ali izogniti se vsakršni nevarnosti za poškodbo ali zdravstveno okvaro.

Nevarnost je okoliščina ali stanje, ki lahko ogrozi ali poškoduje delavca oziroma okvari njegovo zdravje.

Tveganje je velika ali majhna verjetnost, da nevarnost povzroči poškodbo ali zdravstveno okvaro (možne poškodbe ali bolezni).

Tveganje, povezano s posebno situacijo ali tehničnim procesom, izhaja iz kombinacije:

- *verjetnosti, da pride do poškodbe ali zdravstvene okvare, ta je povezana s pogostnostjo dostopa ali časom prisotnosti oseb v nevarnem delovnem okolju (izpostavljenost nevarnosti), in*
- *najvišje predvidljive škode (merilo za škodo na človeku je lahko resnost poškodbe ali zdravstvene okvare (število izgubljenih delovnih dni), ki variira kot funkcija več spremenljivk, ki so le delno predvidljive.*

Ocenjevanje tveganja je sistematično evidentiranje in proučevanje vseh dejavnikov delovnega procesa z namenom ugotoviti možne vzroke za nastanek poškodb pri delu, poklicnih bolezni, bolezni v zvezi z delom ter škode in možnosti preprečevanja, odpravljanja in zmanjševanja tveganj.

Nadzorovanje tveganja pomeni, da se izvedejo vsi možni ukrepi, da delavec ali druga oseba ne bo utrpel(a) poškodbe ali zdravstvene okvare.

Ocena tveganja je operativno orodje, katerega namen je zlasti:

- spoznavanje varnostnih razmer (skrbno raziskovanje, kaj je tisto, kar lahko ogrozi varnost in zdravje delavca),
- oblikovanje strategije ukrepanja (hierarhija – prednostni red ukrepov za dvig varnosti in zdravja pri delu) ter
- način spremljanja za trajno izboljševanje razmer.

Cilj ocene tveganja je zagotoviti, da nihče ne bo poškodovan oziroma ne bo zbolel zaradi dela.

Do odkrivanja tveganja pridemo s:

- a) sodelovanjem z delavci oz. s posvetovanji z njimi, s soočanja z njihovimi pogledi na morebitna tveganja in njihove škodljive učinke;
- b) sistematičnim preverjanjem vseh dejavnikov, ki sestavljajo dejavnost:
 - spremljanje, kaj se dejansko dogaja na delovnem mestu oz. med delovnim procesom (v praksi se lahko delo razlikuje od tega, kar je zapisano v opisu). Delovne razmere, ki bi jih morali obravnavati, so med drugim nove instalacije, prevzem in distribucija, običajne dejavnosti, vzdrževanje in čiščenje ...;

- obravnavanje nestandardnih in občasnih dejavnosti (npr. vzdrževanje, natovarjanje in raztovarjanje, zbiranje vzorcev, spremembe v proizvodnem ciklu);
 - upoštevanje nenačrtovanih, vendar predvidljivih dogodkov, kot so npr. motnje delovnega procesa;
- c) seznanjanjem z dejavniki dela, ki lahko povzročijo škodo (tveganja), in osredotočanjem na tiste, ki imajo zaradi značilnosti delovne dejavnosti večjo možnost pojava.

Osnovno vodilo za izvedbo ocene tveganja je, da naj bo opravljena tako, da bo:

- odkrila vse očitne in skrite nevarnosti in škodljivosti na delovnih mestih;
- omogočila odkrite nevarnosti in škodljivosti opredeliti po velikosti in
- pokazala, ali se je odkritim nevarnostim in škodljivostim mogoče izogniti ali uvesti ukrepe za zmanjšanje preostalih nevarnosti in škodljivosti na sprejemljivo mero.

Ocena tveganja je sredstvo za trajno izboljševanje varnosti in zdravja pri delu.

Ne glede na vrsto postopka ocene tveganja, vsebujejo vsi postopki praviloma naslednje značilne korake:

- opredelitev področja,
- seznam delavcev, njihove značilnosti in opravila,
- sistematični pregled in označba možnih nevarnosti in ogroženosti, ki temelji na: podatkih o dosedanjih poškodbah, zdravstvenih okvarah, poklicnih boleznih, invalidnosti, zmanjšani delovni zmoglosti ipd., podatkih o nevarnostih in škodljivostih pri podobnih delovnih in proizvodnih postopkih,
- kontrolnik (opomnik) ali »check lista« nevarnosti in škodljivosti,
- opredelitev ugotovljenih nevarnosti in škodljivosti (tukaj se metode razlikujejo):
 - po velikosti (kvantitativni postopek) ali po
 - skladnosti s predpisi (kvalitativni postopek),
- izbira vrste ukrepov za odpravo oziroma zmanjšanje nevarnosti in škodljivosti,
- določitev ukrepov: po vsebini, rokih in zadolžitvah za njihovo izvedbo,
- kontrola izvedbe in učinkovitosti izvedenih ukrepov in
- načrt nadaljnjih aktivnosti za zvišanje ravni varnosti in zdravja pri delu.

Postopek ocene tveganja vsebuje ogled delovnega mesta, opredelitev opravil na delovnih mestih, zajame vsa delovna mesta ali pa vsebuje le ocenjevanje posameznih opravil na delovnih mestih. Lahko gre za oceno tveganja pri različnih opravilih, opazovanje poteka dela in/ali ugotavljanje, če so postopki v skladu z delovnimi navodili in ali ni dodatnih nevarnosti. Ocenimo vzorce dela, trajanje izpostavljenosti nevarnostim in škodljivostim, upoštevamo zunanje dejavnike, ki lahko vplivajo na delovno mesto (vreme pri delu na prostem). Pregledamo psihološke, socialne in fizikalne vplive, ki lahko prispevajo k večjemu naporu pri delu, njihov medsebojni vpliv in vpliv organizacije dela ter okolja. Ocenimo organizacijo zagotavljanja ukrepov in varovanja, npr. sistem zajema spremembe, noveliranje podatkov o nevarnostih itd.

Ugotovitve se potem primerjajo s kriteriji za ugotavljanje varnosti na temelju norm. Naredimo prednostni red ukrepov, ki je običajno naslednji:

1. preprečiti nevarnost, nadomestiti nevarnejše z nenevarnim ali manj nevarnim,
2. ukrepati pri viru nevarnosti,
3. uporabiti kolektivne varnostne ukrepe pred osebnimi,
4. urediti splošno ventilacijo namesto osebnih varovalnih sredstev,
5. prilagajanje tehničnemu napredku in sodobnemu spoznanju in znanju ter
6. iskati načine za večjo raven varnosti.

Po opravljeni analizi pooblaščen zdravnik tudi seznanja delavce s tveganji, ki so povezana z njihovim delom na delovnem mestu. Zaželeno je, da v zdravstven vzgojne programe vključi tudi določene teme iz promocije zdravja oziroma bolje rečeno, da zdravstveno vzgojo, ki mu jo predpisuje zakon, vključi v promocijo zdravja kot obliko vzdrževanja zdravja. Za zagotavljanje varnega ravnanja delavcev je potrebno varnostno vzgojo integrirati v proces vsakršnega (permanentnega) usposabljanja za varno in zdravju prijetno delo.

Izvajanje **promocije zdravja** na delovnem mestu je v mnogočem enostavnejše, saj imamo opravka s skupino ljudi, ki jo družijo veliko skupnih značilnosti. Lažje je opredeliti ekonomski učinek promocije zdravja in oceniti rentabilnost vlaganja dodatnih sredstev v izboljšanje zdravja delavcev preko kazalnikov zdravstvenega stanja delavcev, ki so dobro definirani in nekatere v naši državi že zbiramo (npr. bolniški stalež). Taka promocija zdravja mora biti vedno usmerjena v potrebe skupine delavcev, ki ji je namenjena. Poleg vodstva morajo biti vanjo vključeni tudi svet delavcev, sindikat in predvsem delavci sami. Pomembno je, da se delavci poistovetijo z načeli promocije zdravja in programi v njihovem podjetju, da je promocija temeljita in da poseže na vsa področja, ki se ob analizi pokažejo kot pomembna. Vanjo naj se vključujejo različni (ne le zdravstveni) strokovnjaki. Biti mora učinkovita in ekonomsko koristna. Sposobni moramo biti dokazati, da so naša priporočila in programi dosegli cilje, in to na ekonomsko najbolj racionalen način.

Promocija zdravja se razlikuje od drugih orodij v medicini po tem, da je usmerjena v zdravje in ne v bolezen. Zdravja ne postavlja kot cilj naših prizadevanj, ampak kot osnovni pogoj za normalno življenje in tudi delo. Promocija zdravja na delovnem mestu je kombinacija dveh strategij:

- *večanja znanja in veščin posameznika, da se bolje in uspešneje zoperstavlja obremenitvam in škodljivostim v delovnem, domačem in širšem okolju ter*
- *optimalne ureditve delovnega, družbenega ter naravnega okolja tako, da se zmanjša tveganje zaradi obremenitev in škodljivosti.*

Vedno mora biti usmerjena v tiste težave, ki jih imajo delavci v podjetju in, proti tistim obremenitvam in škodljivostim, ki jih delavci občutijo kot težavo in jih kot take ocenimo tudi v analizi tveganja.

V promocijo zdravja vključimo teme o zdravem prehranjevanju, preprečevanju stresa, preprečevanju poškodb na delu in tudi izven delovnega časa, o škodljivi rabi alkohola in drugih psihotropnih snovi ter številne druge teme, ki so pomembne za zdravje ljudi.

O POŠKODBAH PRI DELU

Odnos med dogodkom, nezgodo in poškodbo je mogoče formalno zapisati na naslednji način:

vsak dogodek	≠	ni nezgoda
nezgoda	=	je vedno dogodek
vsaka nezgoda	≠	ni poškodba
vsaka poškodba	=	je vedno nezgoda

Poškodba

je okvara zdravja, ki je nastala 24 do 48 ur po delovanju škodljivega dejavnika, sicer gre za bolezen.

Poškodba pri delu je poškodba zavarovanca, ki je posledica neposrednega in kratkotrajnega mehanskega, fizikalnega ali kemičnega učinka, posledica hitre spremembe položaja ali nenadne obremenitve telesa in drugih sprememb fiziološkega stanja organizma, če je takšna poškodba v vzročni zvezi z opravljanjem dela ali dejavnosti, na podlagi katere je zavarovanec zavarovan (Zakon o pokojninskem in invalidskem zavarovanju).

Za poškodbo pri delu se šteje tudi poškodba, povzročena na opisani način, ki jo utрпи zavarovanec na redni poti od stanovanja do delovnega mesta ali nazaj, na poti, da opravi delovne naloge, da nastopi delo.

Za poškodbo pri delu se šteje tudi obolenje zavarovanca, ki je neposredna ali izključna posledica nesrečnega naključja ali višje sile med opravljanjem dela oziroma dejavnosti, na podlagi katere je obboleli zavarovanec.

Za poškodbo pri delu se šteje tudi poškodba, povzročena na opisani način, ki jo utрпи zavarovanec ali delovni invalid v zvezi s pravico do zdravstvenega varstva, če nastane na redni poti od stanovanja oziroma delovnega mesta do kraja zdravniškega pregleda ali zdravljenja, v kraju in ob vračanju do kraja, v kraju ali ob vračanju, če je bil spremljevalec, ali pa če je šel po protezo ali ortopedski pripomoček.

Iz definicije poškodbe na delu izhaja, da sta za priznavanje poškodb na delu pomembni dve dejstvi: da je prišlo do okvare naglo – akutno in da je nastala okvara vezana na opravljanje poklicne dejavnosti.

Zaradi take definicije se tudi vse akutne zastrupitve prijavljajo kot poškodbe na delu. Poškodbe na delu so tudi poškodbe, ki jih delavec utрпи pri opravljanju dela, na katerega ni razporejen, vendar ga opravlja v interesu delodajalca, pri katerem je zaposlen, pri prihodu na delo in odhodu z njega, če pri tem koristi najkrajšo pot, poškodbe, ki jih pretrpi na poti zaradi izvrševanja službenih aktivnosti, pa tudi s pravico prerazporeditve na drugo delo, prekvalifikacije ali dokvalifikacije, v zvezi s koriščenjem pravic iz zdravstvenega varstva, v akcijah reševanja ob elementarnih nezgodah ...

Vzroki poškodb pri delu

Vzroki poškodb in zdravstvenih okvar pri delu so mnogoštevilni in odvisni od več dejavnikov:

- vrste in načina opravljanja dela,
- higienskih delovnih razmer,
- socialnoekonomskih dejavnikov,
- kvalifikacije in izobrazbe zaposlenih,
- kulture in
- motivacije zaposlenih.

Vzroke poškodb lahko razdelimo v dve večji skupini:

1. vzroki, kjer prevladuje človeški dejavnik;
2. vzroki, ki izvirajo iz človeškega okolja.

V prvo skupino spadajo:

- nezgodni primeri, v katerih človek bistveno vpliva na pojav nezgode, poškodbe:
 - nepoznavanje mehanizma dela, nevarnosti in sredstev za osebno varnost,
 - karakterne lastnosti, psihofizična pripravljenost, starost, delovna doba,
 - nemotiviranost, bolezenska stanja;
- nezgodni primeri, do katerih pride zaradi nepravilnih postopkov sodelavcev:
 - slabo sodelovanje med delavci;
- nezgodni primeri zaradi slabe organiziranosti dela (odgovornost na vseh nivojih).

V drugo skupino pa spadajo:

- neugodne mikroklimatske razmere,
- prisotnost snovi, ki vplivajo na koncentracijo in delovno zmožnost,
- delo z nepopolnimi stroji in orodji,
- zasičenost delovnega prostora s surovinami, izdelki ali odpadki,
- slaba osvetljenost,
- hrup, vibracije,
- spolzka tla,
- nepopolna splošna in osebna varovalna sredstva.

V drugi skupini opozarjamo na dejavnike delovnega okolja: razsvetljava (preslaba osvetljenost, bleščanje), toplotne razmere (motnje psihomotorike pri nizki temperaturi, zaspanost pri visoki temperaturi itd.), hrup (zmanjšanje pazljivosti, preglaševanje signalov za nevarnost itd.). Prav tako imajo pomembno mesto psihološki dejavniki delovnega okolja (medčloveški odnosi v podjetju) in organizacija dela (delovni čas, odmori pri delu, nadurno delo, intenzivirano delo, monotono delo), tehnična organizacija dela (dovoz in odvoz materiala, prehodnost delovnih poti, odpadki na tleh, tla, ki drsijo, in podobno) in sredstva za delo (viličar, stružnica itd.).

Zelo pomembni dejavniki delovnega okolja so tudi stroji in naprave, za katerih neustreznost pa je največkrat v največji meri kriv sam uporabnik in le redko neodpravljava tehnična pomanjkljivost. Posebno nevarnost predstavljajo nezaščiteni, gibajoči se deli strojev, pomemben dejavnik pa je tudi zatrtost delovnih prostorov, nered in nečistoča.

Neugodni delovni pogoji redko predstavljajo direkten vzrok poškodovanja. Pogosto delujejo posredno s tem, da privedejo do utrujenosti (nizke ali visoke temperature, slaba osvetljenost, bleščanje, sence, migetanje, hrup, plini, pare in aerosoli, pa tudi vibracije, ultra in infra zvok itd.).

Pomemben dejavnik je tudi neupoštevanje navodil za varno delo in neupoštevanje predpisanih kolektivnih in osebnih varovalnih ukrepov.

V drugo skupino prištevamo tudi dejavnike, ki delujejo izven delovnega okolja in se odražajo na človekovem zdravju in psihofizični sposobnosti:

- slabe socialnoekonomske razmere (stanovanje, prehrana, družinske razmere),
- utrujenost zaradi drugega dela (izven službe) zaradi prihoda na delo,
- uživanje alkohola, narkotikov, zdravil itd.,
- nezdravi medosebni odnosi (v družini ali izven nje).

KONTAKTNI DERMATITIS IN DELOVNO OKOLJE

Najpogostejše kožno obolenje, ki nastane zaradi reakcije kože po stiku z različnimi spojinami ali po vplivu zunanjih fizikalnih agensov na kožo, je kontaktni dermatitis (vnetje kože). Reakcija lahko poteka na dva načina: alergijsko ali nealergijsko. Alergijska reakcija kože je specifična za vzročno spojino, zahteva predhodno senzibilizacijo (razvoj občutljivosti) osebe in se praviloma pojavlja le pri manjšem deležu populacije, ki je genetsko predisponirana za pojav senzibilizacije na dane snovi. Po drugi strani pa so reakcije kože na dražljive in toksične snovi nespecifične in ne zahtevajo senzibilizacije. Reakcije na te snovi se na izpostavljeni koži praviloma lahko pojavljajo pri vseh ljudeh, čeprav je mogoča precejšnja variabilnost v občutljivosti kože posameznika. Mnogi alergeni so istočasno tudi kožni iritansi, toda mejna iritativna koncentracija je praviloma mnogo višja kot tista, ki sproži senzibilizacijo.

Dermatitis simpleks (toksični kontaktni dermatitis)

Dermatitis simpleks nastane zaradi draženja ali celo kratkotrajnega toksičnega delovanja škodljivih vplivov na kožo. Pojavlja se že po enkratnem stiku kože z vzročno nakso (dejavnikom) iz okolja in se razvije hitro, večinoma v nekaj urah. Kontakt je običajne akcidentalne narave. Vzročne nakse so največkrat kemične (kislina, alkalije, anorganske in organske kemikalije), včasih pa tudi fizikalne narave (mehanični, termični, aktinčni vplivi, UV žarki, vročina, mraz). Nekateri agensi lahko povzročajo obe obliki dermatitisov. Detergenti npr. v visokih koncentracijah lahko povzročijo toksični, pri nizkih koncentracijah in ponavljajočih se kontaktih, pa iritativni dermatitis. Pogoj za reakcijo kože je primarna škodljivost snovi ali vpliva, ki pride od zunaj v dotik s kožo. Posledica je odvisna od koncentracije in časa delovanja (kemičnega delovanja oziroma reakcije). Zato nastanejo spremembe na koži ali sluznici pri vsakem prizadetem človeku. Do neke mere je intenzivnost vnetja odvisna tudi od dispozicije oziroma konstitucije ter drugih lastnosti kože. Pojavijo se po prvem dotiku in ostanejo omejene na mesto delovanja ter po prenehanju škodljivega vpliva počasi same po sebi izginejo. Glede na stopnjo škodljivosti in čas vplivanja nastanejo na koži reaktivne spremembe, ki se stopnjujejo od navadnega eritema (rdečine) do vezikulozne (mehurček) in mehurjaste reakcije ali celo do nekroze (odmrtja). Značilno je, da so spremembe na prizadeti koži ostro omejene od zdrave okolice, oziroma ostro omejene na predel kože, ki je bil izpostavljen.

Mehanizem delovanja je lahko različen:

- dehidratantno delovanje (kislina, lug),
- oksidantno delovanje (kalijev permanganat, peroksid, kromova kislina),
- lipolitično delovanje (trikloretilen, eter, alkohol, bencin),
- protein precipitirajoči učinek (pikrinska kislina, soli težkih metalov),
- keratolitični učinek (salicilna kislina)
- in drugi.

Dermatitis detritiva (iritativni kontaktni dermatitis)

Dermatitis detritiva nastane zaradi nespecifične in nealergijske občutljivosti kože, ki se razvije po številnih ponovnih dotikih (kumulativni iritansi) s primarno neškodljivimi snovmi (oziroma nizkimi koncentracijami snovi), ki ob enkratnem stiku še ne povzročijo bolezenskih sprememb, imajo pa

vendarle lastnosti, da sčasoma poškodujejo površino kože in jo oropajo njenih naravnih varovalnih lastnosti.

Največkrat so to alkalne snovi, npr. blagi lugj, apno, kreda, cementna voda, mila, detergenti, čistila itd., redkeje nekatera organska topila. Izpostavljenost je dolga in traja, lahko več mesecev ali let. Tako nastane okvara kožne lojne prevleke, raztopi se keratinska plast, zmanjša se sposobnost nevtralizacije alkalij in tako imenovani kisli kožni plašč postane nevtralen ali celo alkalen. Zaradi povečanega izhlapevanja vode se izpostavljeni deli kože čezmerno osušijo, razpokajo in vnamejo (zato se obolenje razvija hitreje pri ljudeh, ki imajo že sicer bolj suho kožo). Posledica je večja občutljivost kože za sicer nenevarne naravne dražljaje okolice in hkrati večja sprejemljivost za okužbe z bakterijami in plesnimi. Taka koža se lahko tudi sekundarno ekcematizira.

Prizadeta koža je suha in hrapava, kasneje se pojavijo znaki vnetja, dokler se končno ne razvije kronično proliferativno vnetje, ki ga klinično težko ločimo od kronične oblike kontaktnega alergijskega dermatitisa. Prizadeta koža bolnika peče, včasih tudi srbi. Zvečine so prisotna neostro omejena žarišča pordele, infiltrirane in keratotično zadebeljene kože, ki se grobo lušči. Na njej so pogoste ragade. V večini primerov je detritivni dermatitis omejen na kožo rok in podlahti in ga srečujemo zlasti pri zidarjih, soboslikarjih, pleskarjih, čistilcih, pericah in frizerkah.

Pojavljane relativno velikega deleža primerov kontaktnih dermatitisov je povezano z delovnim okoljem. Najpogostejši dražeči in/ali toksični dejavniki, ki se pojavljajo v delovnem okolju, so: kisline, baze, organska topila, mila, detergenti, naftni derivati, hladilne emulzije, oksidanti, reducensi, encimi, fizikalni dražljivci (steklena volna, papir), deli rastlin, dolgotrajna izpostavljenost kože vodi itd. Med poklici z visokim tveganjem za pojav poklicnega toksičnega ali iritativnega kontaktnega dermatitisa so predvsem: gradbeni delavci, čistilke, kovinostrugarji, zaposleni v gostinstvu, avtomehaniki, delavci v gumarski in usnjarski industriji, v elektroindustriji, frizerji, pleskarji, peki, mesarji, zaposleni v zdravstvu, tekstilni industriji, kmetijstvu itd.

Poklicni alergijski kontaktni dermatitis (eczema vulgare e professione)

Alergijski kontaktni dermatitisi na eni ter iritativni in toksični kontaktni dermatitisi na drugi strani imajo mnoge skupne klinične in histopatološke značilnosti, zato jih je dostikrat težko opredeliti. Podatki v literaturi kažejo, da ima približno 80 odstotkov bolnikov s kontaktnim dermatitisom iritativni ali toksični dermatitis in le 20 odstotkov alergijski kontaktni dermatitis.

Alergijski kontaktni dermatitis je kronična alergična, recidivantna dermatoza IV. tipa preobčutljivosti (celična imunost), ki se manifestira po stiku kože občutljive osebe z ekcematogenom. Danes je poznanih že okrog 3.000 kemikalij, ki lahko delujejo kot kontaktni alergeni.

Ekcemске spremembe so posledica vezave ekcematogena z receptorji na površini specifično senzibiliziranih limfocitov T ob sodelovanju dendritičnih Langerhansovih celic in sproščanju limfokinov.

V nastanku poklicnega ekcema ločimo tri faze:

1. faza senzibilizacije:

Hapten – nizkomolekularna kemična spojina – se v epidermisu veže na tkivne beljakovine in nastane ekcematogen. Ekcematogen se veže na MHC II molekule na plazmalemi epidermalnih Langerhansovih celic, ki se aktivirajo, potujejo iz epidermisa v dermis ter po mezgovnicah v regionalne bezgavke. V parakorteksu bezgavk prezentirajo ekcematogen limfocitom T. Če pridejo v stik z limfocitom T, ki ima za ekcematogen specifične receptorje, se ta začne razmnoževati in nastane klon specifično senzibiliziranih limfocitov. Kri jih zanese v kožo po vsem telesu, ki tako postane senzibilizirana. Močno ekcematogene spojine (npr. dinitroklorobenzen) povzročijo senzibilizacijo že v desetih do štirinajstih dneh po prvem stiku s kožo, medtem ko traja ta proces pri veliki večini ostalih spojin dalj časa; največkrat pride do senzibilizacije po ponavljajočih se stikih šele po več letih.

2. faza – obdobje latence:

Traja več let, čemur lahko sledi spontana desenzibilizacija, včasih pa ostane oseba občutljiva vse življenje.

3. faza – reakcija:

Reakcija nastane pri ponovnem stiku ekcematogena s senzibilizirano kožo. Antigen se s posredovanjem Langerhansovih celic v koži veže na limfocite T, ki preidejo v aktivirane limfocite T, ki izločajo limfokine in zato pride do eritema, papul (bunčic) in mehurčkov.

Ekcematogene snovi so same po sebi neškodljive, zato se razvije ekcemska reakcija samo pri preobčutljivih posameznikih. Ekcematogeni agens običajno po prvem stiku ne povzroča vidnih sprememb na koži, povzroča pa jo lahko, če se ta ponovi. Ekcematogena sposobnost je različna: po pravilu so svetlopolti ljudje občutljivejši od temnopoltih, mladi delavci so bolj občutljivi od starejših in prav tako tisti z atopijo in nekaterimi boleznimi kože, npr. psoriazo. Nekatere snovi so močno ekcematogene: dinitroklorobenzen, parafenilendiamin, epoksidne smole, vendar se redko pojavijo v vsakdanjem življenju, druge pa imajo manjšo ekcematogeno sposobnost, vendar pride človek z njimi – čeprav v nizkih koncentracijah – pogosto v stik in so zato ekcemi te vrste dokaj pogosti (6-valentni kromati, nikljeve in kobaltove spojine, terpentini, formaldehid, anilinske barve, peruanski balzam, nekatere smole pa tudi zdravila za lokalno rabo, predvsem sulfonamidi, penicilin, neomicin itd.).

Na ekcematogen je vselej občutljiva vsa koža. Ekcemska žarišča se pojavljajo le na mestu stika z ekcematogenom in so neostro omejena od zdrave kože. Pojavijo se lahko tudi drugje, kjer koža ni bila izpostavljena neposredno – tem žariščem pravimo ekcematid.

Klinična slika je lahko akutna, subakutna ali kronična in je odvisna od:

- stopnje preobčutljivosti,
- koncentracije antigena,
- lastnosti kože in
- časa izpostavljenosti.

Za akutno fazo ekcema je značilno akutno vnetje kože, ki je eritematozna (rdečkasta), včasih edematozna (nabrekla), pokrita s številnimi papulami (bunčicami), vezikulami (mehurčki) in erozijami (razjedami), lahko pa tudi s krastami in luskami (polimorfizem je ena pomembnejših značilnosti, druga značilnost je neostro omejitev od zdrave kože in tretja je srbenje). Ekcem se največkrat pojavlja na rokah, podlahteh in obrazu.

Za subakutno obliko so značilne proliferativne spremembe, zlasti rdečkaste papule; poleg teh se lahko pojavijo tudi posamezne vezikule in zmerno luščenje, zaradi srbenja pa so pogosto prisotne tudi opraskanine.

V kronični fazi prevladuje infiltrativno vnetje s keratotično zadebeljeno, rdečerrjavkasto obarvano kožo, ki je pokrita s papulami in luskami ter se lušči in močno srbi. Koža je lahko razpokana (zmanjšana elastičnost), pride do ragad, ki se lahko (zaradi praskanja) inficirajo.

Diagnoza poklicnega ekcema:

- anamneza:
- splošna,
- delovna,
- čas nastanka prvih sprememb,
- recidivi (ali so povezani z opravljanjem dela, ali so izboljšanja povezana z bolniškim staležem, dopustom, porodniško ...),
- opis delovnega procesa,
- obolevnost sodelavcev,
- potek bolezni po eventuelni spremembi delovnega mesta,
- podatki o honorarni zaposlitvi,
- lokalizacija ekcemskih žarišč (mesta, ki so izpostavljena),
- klinična slika,
- pozitivni epikutani testi za poklicne alergene.

Ob splošni in delovni anamnezi ter klinični sliki je za diagnozo poklicnega kontaktnega alergijskega dermatitisa ključno epikutano testiranje (krpični testi), ki ga izvaja in vrednoti za to področje posebej

usposobljen dermatolog. Poleg testiranja s standardnimi kontaktnimi alergenimi se testira dodatno (ciljano) z vzorci iz delovnega okolja, ki so pri delu v stiku s kožo.

Kontaktne alergene delimo na ubikvitarne, s katerimi se srečujemo v vsakodnevnem življenju, in poklicne, ki so specifični za posamezna delovna mesta. Zavedati pa se moramo, da na mnogih delovnih mestih obstaja izpostavljenost ubikvitarnim alergenom, ki v tem primeru postanejo poklicni alergen za to delovno mesto (npr. nikelj kot ubikvitarni alergen postane poklicni za šiviljo, gradbenika, keramičarja ...).

Med kontaktnimi alergenimi je po podatkih iz literature najpomembnejši nikelj. Vzrok je predvsem ceneni nakit. Med najpogostejšimi ekcematogeni so tudi krom, formaldehid in kobalt, močno pa se povečuje tudi pogostnost kontaktnih alergij na zmes dišavnih spojin (Fragance – Mix), ki jih najdemo zlasti v kozmetičnih izdelkih za osebno higieno.

Okrog 10 do 15 odstotkov vseh primerov kontaktnega alergijskega dermatitisa pri nas povzročajo alergen iz poklicnega okolja. Mnogi med njimi (npr. krom, formaldehid, kobalt, sestavine gume, parafenildiamin, epoksidne smole ...) so med najpogostejšimi povzročitelji kontaktnega alergijskega dermatitisa nasploh.

Kontaktne alergijske dermatitise se najpogosteje pojavljajo pri delavcih v:

- *kovinski industriji*: kromati, spojine niklja, hladilna olja, mazalna olja, organska topila, barve, laki, antioksidanti, naravne in umetne smole itd.;
- *galvanizaciji*: krom, cink, nikelj;
- *gradbeništvu*: cement (kromat in iritansi, trdilci v cementu), kobalt, nikelj, lepila, izolacijski materiali, rokavice;
- *elektroindustriji*: kromati, spojine niklja, kobalt (spajkanje), organska topila, umetne smole;
- *kemični in farmacevtski industriji*: topila in različne druge kemikalije;
- *tekstilni industriji*: barve, kromati, apreturna sredstva, sredstva za impregnacijo, olja;
- *industriji usnja*: barve, kromati, parafenildiamin, formalin, terpentini, lepila, umetne smole, topila;
- *industriji gume*: barve, antioksidanti, topila, akrelatorji pri vulkanizaciji;
- *grafični industriji*: barve, terpentini, formalin, olja, krom;
- *lesni industriji*: smole, terpentini, barve, laki, lepila, les;
- *fotografiji*: kromati, hidrokinon, natrijev tiosulfat, pirogolol;
- *pri pleskarjih in ličarjih*: terpentini, barve (krom, anilin), laki, lepila, umetne smole;
- *frizerstvu*: barve za lase, (parafenildiamin), eterična olja, kozmetični preparati, preparati za trajno ondulacijo – tioglikolna kislina, guma;
- *kmetijstvu*: umetna gnojila, pesticidi, rastline;
- *zdravstvu*: sredstva za dezinfekcijo, krom, nikelj, kobalt, akrilati, guma (rokavice – latex), formaldehid, jod, lokalni anestetiki, antihistaminiki, antibiotiki;
- *uradih*: črnila, barve, papir, lepila.

Preventivni ukrepi naj se začnejo že v fazi poklicnega usmerjanja pri poklicni orientaciji in selekciji. Epikutani testovi za ugotavljanje atopije v smislu preventive ne delamo. Zelo pomembni so zdravstvena vzgoja že v uvajalni fazi dela ter splošni zaščitni ukrepi tehničnega varstva pri delu, kjer posebej izpostavljamo osebno higieno.

Zdravljenje je simptomatsko.

Če se dokaže, da je vzrok bolezni poklicna izpostavljenost, delavca takoj prestavimo na drugo delovno mesto, kjer ne bo več prihajal v stik s povzročiteljem.

Kontraindikacije za zaposlitev na delih, kjer obstaja nevarnost za nastanek poklicnih dermatoz so delavci s kroničnimi dermatozami in osebe, pri katerih je koža že konsitucionalno spremenjena.

Osebno varstvo obsega sredstva in opremo za osebno varnost pri delu in ustrezne higienske ukrepe. Poudariti moramo, da je prepovedano uporabljati različna topila za čiščenje kože (bencin, nafta, terpentini).

POKLICNA ASTMA

Astma je kronična bolezen pljuč, ki nastane zaradi reverzibilnega spazma bronhijev v obliki– epizod dušenja.

Poklicna astma je bolezen, za katero je značilna variabilna obstrukcija dihalnih poti in/ali bronhialna preodzivnost in ki jo povzročajo dejavniki in okoliščine, značilni za določeno delovno okolje, in ne povzročitelji izven delovnega mesta. Astmo, ki se pojavlja na delovnem mestu zaradi nespecifičnih dražljajev (iritantov), lahko štejemo za poklicno. Poklicna astma se lahko pridruži k že obstoječi astmi.

Diagnoza poklicne bolezni se ne razlikuje od klinične v ničemer drugem kot v izpostavljenosti ali etiologiji. Poklicna kategorija bolezni je pomembna predvsem zaradi praktičnega razloga, ki se kaže v pravicah delavca, ki je poklicno bolan, in seveda v terapiji delovnega okolja ter raziskovalnega razloga, ki le raziskuje, kolikšen je delež delovnega okolja pri nastanku bolezni oz. minimalni vzrok.

Glede na to, ali se pojavi astma po latentnem obdobju po začetku izpostavljenosti, razkrijemo dva tipa poklicne astme:

1. **imunska oblika** – primeri poklicne astme, ki se pojavi po latentnem obdobju in ki zajema:
 - a) poklicno astmo, ki jo povzročajo večinoma visokomolekularni in nekateri nizkomolekularni povzročitelji in za katere je bil dokazan imunski mehanizem (IgE posredovan);
 - b) poklicno astmo, ki jo povzročajo specifični poklicni povzročitelji in ki se razvije po latentnem obdobju, pri kateri pa ni bil dokazan z IgE posredovan imunski mehanizem (npr. zahodna rdeča cedra);
2. **neimunska oblika** – zajema iritativno povzročeno astmo; razvije se po enkratni ali večkratni izpostavljenosti nespecifičnim dražljivcem v visokih koncentracijah.

Poklicna astma se lahko razvije le pri manjšem deležu izpostavljenih po latentnem obdobju, ki -variira od nekaj mesecev do več let. Tipični simptomi astme, kot so kašelj, piskanje, stiskanje v prsnem košu, se lahko pojavijo na delu v nekaj minutah po izpostavljenosti. Zelo pogosto se pojavijo šele po več urah ali celo ponoči. Ponavadi se poslabšujejo med delovnim tednom. Na začetku bolezni nastopi izboljšanje ob vikendu ali na dopustu, kasneje pa tudi tu ne več.

Razvoj poklicne astme je enako kot pri nepoklicni astmi povezan z razvojem nespecifične bronhialne preodzivnosti. Pogosto zato astmatske epizode izzove tudi izpostavljenost hladnemu zraku ali naporu. Anamnestični podatek o navedenih nespecifičnih sprožilcih astme se ne sme uporabiti kot argument, da ne gre za poklicno astmo.

Pri velikem delu bolnikov s poklicno astmo opazimo tudi alergijski rinitis in konjunktivitis, katerih simptomi se, zlasti pri astmi povzročeni z velikomolekularnimi alergeni (pekarska astma), običajno pojavijo pred simptomi astme.

Bronhokonstrikcijo lahko povzročijo različni etiološki dejavniki:

- inhalacijski alergeni,
- fizikalni in kemični dražljivci,
- farmakološko aktivne substance,
- virusne okužbe,
- zdravila,
- nespecifični dejavniki: fizični napor, čustva, stres, nervoza, strah in drugi nevropsihogeni dejavniki.

Za nastanek spazma obstaja več patogenetskih mehanizmov:

- alergijska, atopijska hipersenzibilizacija (ekstrinzična bronhialna astma posredovana s protitelesi IgE),
- refleksna bronhokonstrikcija, izzvana z delovanjem mehaničnih, fizikalnih ali kemičnih dražljivcev na bronhialno mišičje v okviru bronhialne preodzivnosti (formaldehid, izocianat, žveplov dioksid in drugi dražljivci),
- akutna vnetna bronhokonstrikcija (virusne okužbe, zlasti rinovirusi),
- farmakološka bronhokonstrikcija – snovi podobne histaminu (formalin),
- astma zaradi telesnega napora (nespecifična) in
- emocionalna ali psihogena bronhialna astma (hiperventilacija, refleksi).

Poklicno astmo lahko povzročijo tudi dražljivci.

Pri poslabšanju astme gre najpogosteje za prvi tip alergijske reakcije po Coombsu in Gelu. Protitelesa so imunoglobulini E, ki se vežejo na površino mastocitov in bazofilnih levkocitov. Z vezavo IgE protiteles in alergenov se sproži kompleksna pot alergijskega vnetja, ki zajema aktivacijo mastocitov, eozinofilcev in limfocitov Th2 ter številnih drugih celic. Sproži se proizvodnja alergijskih citokinov IL4, IL5 in IL13, histamina, prostaglandinov ter drugih vnetnih mediatorjev, ki v pljučih povzročajo skrčenje gladkega mišičja bronhijev in povečujejo vaskularno permeabilnost z ekstravazacijo, edemom bronhialne sluznice in nastankom značilnega viskoznega sekreta.

Alergijska reakcija je lahko takojšna ali kasna (nekaj ur po izpostavljenosti). Takojšnja reakcija se pojavlja pri senzibilizaciji na antigene velike molekularne mase in pri inhalaciji respiratornih iritansov nekaj minut po inhalaciji in traja 30 do 60 minut. Obstrukcija je povzročena s sproščanjem mediatorjev (histamina, prostaglandinov in drugih). Kasna alergijska reakcija pa se pojavlja 4 do 6 ur po ekspoziciji, doseže svoj maksimum po 5 do 8 urah in traja najdlje en dan. Kasna alergijska reakcija je karakteristična za poklicno astmo sproženo z nizko molekularnimi alergeni. Lahko pa je reakcija tudi dvojna (takoj po kontaktu in kasna reakcija po 4 do 6 urah). Ta tip reakcije je najpogostejši pri alergijski astmi (celo do 50 %), možen pa je tudi pri vnetni obliki. Astmatična, vneta dihalna so tudi nespecifično preodzivna in se pretirano odzivajo na okolje, kot so hitre spremembe temperature, telesni napor, vdihovanje dražečih plinov ali psihično razburjenje. Simptomi astme se pojavijo nenadoma s kašljem ali z občutkom dušenja. Dihanje je oteženo – spočetka le ekspirij s tipičnim piskanjem. Bolnik ob hudem poslabšanju astme običajno sedi, je blede, čelo ima orošeno s hladnim znojem, z izrazom strahu. Pri telesnem pregledu ugotovimo polifonične piske v podaljšanem ekspiriju ali kasneje tudi v inspiriju. Ob zelo hudem poslabšanju pa piskanje zaradi prenizkih pretokov izgine – »tih prsni koš«.

Preglednica 1: Nekateri poklici ter z njimi povezane snovi, ki lahko privedejo do nastanka poklicne astme (organske visokomolekularne snovi).

Poklic	Vzročna snov
farmacevtska industrija	penicilin in njemu podobne snovi, cefalosporin, sulfatazol, cimetidin, spiromicin, tetraciklin, ampicilin
predelava detergentov	Bacillus subtilis, esperaze
predelava encimov	papain, pektinaze, tripsin, pankreatin, bromelain, diastaze, pepsin, glikolitični encimi
izdelava kozmetičnih proizvodov in frizerji	naravna barvila (karmin), barve za lase (p-fenilendiamin, o-nitro-p-fenilendiamin, aminodifenilamin), ekstrakt kane, človeška dlaka
ličarji	barve (akrilati, poliuretan), lepila (naravni lateks), izocianati
tekstilni delavci	prah konoplje, volne, bombaža in lana
izdelava in uporaba lateksa	lateks – tekočina in prah škroba mešan z delci lateksa
prehrambena industrija	česen, surov krompir, repa, stročnice, zelena, korenike, začimbe, rastlinska lepila, kakavovec, moka
peki	žitna moka (pšenica, ječmen, riž), soja, žitni žužek,

	plesni, insekti
predelava kave in čajev	prah surove kave in čaja
ekstrakcija semenskega olja	ricinus, lan, psyllium in ispaghula (laksativ)
predelava piva	hmelj, ječmen, plesni
predelava in gojenje gob	plesni gob
predelava tobaka	tobačni prah
predelava lesa (gozdni delavci, lesna industrija)	lesni prah (jesen, sekvoja, oreh, hrast, ebenovina, mahagoni, zahodna rdeča cedra)
poljedelci, mlinarji	žitarice, plesni, insekti, pesticidi
živinorejstvo, svinjereja	živalske dlake, ekskreti, živalska krma
predelava živalske hrane	prah sestavin živalske hrane
vzreja ptic	perje, ekskreti, živalski odpadki
delo z živalmi (kmetje, laboratorijski delavci)	perje, dlake, urin, serum, odpadki epidermisa
ribiči	morski organizmi, hrana za ribe
izdelava suhega cvetja	prah suhega cvetja
knjigovezi in poštarji	lepila
predelava krzna	krzno, barve (paraferenidiamin, kromati), živalska dlaka
elektronska industrija	kolofonija (pri spajkanju)
delo v kanalizaciji	insekti

Preglednica 2: Nekateri poklici ter z njimi povezane snovi, ki lahko privedejo do nastanka poklicne bronhialne astme (anorganske nizkokomolekularne snovi).

Poklic	Vzročna snov
kemijska industrija	azo-barve in reaktivne barve, sulfonekloramidi, eilendiamini, paraferenilendiamini, antrakini, dizocijani
predelava epoksi smol in plastike	ftalični anhidrid, ostali anhidridi, dizocijani, trimelitik anhidrid, tetraklorohtalik anhidrid
galvanizacija, strojenje kože, cementarstvo, gradbeništvo	solni kovinski: krom, nikelj, platina, kobalt
poliuretanska industrija	izocijani, dizocijani
avtomobilarstvo	heksametilni dizocijan
pakiranje mesa	polivinil klorid
frizerji	solni persulfata
delo s pesticidi	organofosforne spojine

Poklicna astma se kaže z enakimi simptomi kot nepoklicna. Vedeti je treba, da ni možna stroga časovna povezava med delom in simptomi. Zlasti na začetku bolezni ima bolnik simptome zaradi dopoldanskega dela šele popoldne ali zvečer ali le v obliki nočne astme. Na bolezen moramo pomisliti, če se simptomi pomirijo konec tedna ali ko je delavec na letnem dopustu. V kasnejših fazah pa simptomi tudi po daljših odsotnostih z dela ne popustijo.

Potrditev astme:

Testi za potrditev astme so:

- dokaz reverzibilne bronhialne obstrukcije – bronhodilatacijski test. Bronhodilatacijski test opravimo z merjenji FEV₁ pred ter 20 minut po 4 vdihih salbutamola. Test je pozitiven, če FEV₁ poraste glede na referenčno vrednost za vsaj 12 % ter za vsaj 200 ml. Test je diagnostičen za astmo, kadar so po salbutamolu FEV₁ normalne. Negativni test ne izključuje astme;
- bronhialni provokacijski test z metaholinom ali histaminom;
- serijske meritve največjega pretoka izdihanega zraka - PEF (meritve vsaj dva tedna, vsaj štiri meritve dnevno; dnevna variabilnost, ki presega 20 %, kaže na prisotnost astme).

Bronhialni provokacijski test z metaholinom (metaholinski test)

Bolnik vdihuje naraščajoče odmerke metaholina. Rezultat izražamo z odmerkom metaholina, ki je povzročil 20-odstotni padec FEV₁, glede na FEV₁ izmerjen po aplikaciji fiziološke raztopine (PD20). Pozitiven metaholinski test ni diagnostičen za astmo. Verjetnost astme se večja z zmanjševanjem provokacijskega odmerka metaholina. Najvišjo vrednost ima metaholinski test pri izključevanju astme, saj negativen test z zelo veliko verjetnostjo izključuje astmo. Ravno tako je izključena poklicna astma, če je metaholinski test negativen v času izpostavitve na delovnem mestu in ob tem prisotni simptomatiki.

Ali je priporočljivo metaholinsko testiranje pred nastopom dela?

Jasnih dokazov za to ni, bi bil pa zelo dobrodošel podatek o negativnosti metaholinskega testa pred nastopom dela in o njegovi pozitivizaciji ob delu pri oceni verjetnosti poklicne astme.

Serijske meritve največjega pretoka izdihanega zraka (PEF)

Pri meritvah PEF skušamo dokazati variabilnost pretokov pod vplivom izpostavljenosti na delovnem mestu. Vsako meritev je potrebno ponoviti trikrat, razlika med posameznimi meritvami naj ne bi presegla 10 %. Bolnik s poklicno astmo bo v času dela izmeril manjše vrednosti PEF kakor v času izven dela.

Dnevna variabilnost =

$$\frac{\text{najvišji PEF} - \text{najnižji PEF}}{\text{najvišji PEF} + \text{najnižji PEF}} \times 100 \quad (\text{v } 24 \text{ urah})$$

Tu navajamo le enega od mnogih protokolov merjenja PEF. Ob tem bi poudarili, da priporočamo uporabo elektronskih merilcev PEF, ki onemogočajo vnašanje lažnih podatkov, opazno pa olajšajo analizo merjenj.

Delavec meri PEF 5 tednov (prvi teden dela, drugi in tretji teden ne dela, nato spet dva tedna dela) vsaki dve uri, tudi takrat, ko ni na delu. Meri ga zjutraj, ko vstane, pred delom izven obrata, pol ure po začetku dela, uro po začetku dela, 3 ure po začetku dela, 5 ur po začetku dela, ob zaključku dela in tudi popoldne doma vsaki dve uri do spanja. Ob vsaki meritvi poleg rezultata vpisuje tudi ostale znake: kašelj, pekoč občutek, uro jemanja ali vdihavanja zdravila in naziv zdravila ter druge opombe. Pri vsaki meritvi opravi tri merjenja. Ves čas meritev mora uporabljati zdravila v istih dozah kot sicer. V primeru, da se ugotovljeno poslabšanje rezultatov opravljenih meritev ujema s tedni, ko je delal, in izboljšanje rezultatov s tedni, ko ni bil eksponiran, v več kot 75 %, to kaže na potrditev diagnoze poklicne astme.

Potrditev povezanosti bronhialne obstrukcije z delom:

- serijske meritve PEF (ne identificiramo vzročnega dejavnika),
- serijske meritve nespecifične bronhialne preodzivnosti (bronhialna preodzivnost se ob izpostavljenosti senzibilizirajočemu agensu poveča).

Serijske meritve nespecifične bronhialne preodzivnosti

Bronhialna preodzivnost se ob izpostavljenosti senzibilizirajočemu dejavniku poveča, po prekinitvi izpostavljenosti pa lahko zmanjša. Metoda je uporabna predvsem v kombinaciji s serijskimi meritvami PEF-a. Meritve morajo biti opravljene v času 2 do 3 dni po prenehanju izpostavljenosti ali po dveh tednih po ponovni vrnitvi na delo. Pri tem se določa provokativna koncentracija in provokativna doza metaholina ali histamina, ki povzroči 20 % padec FEV₁. Pri testu z PD20 >2 mg metaholina je diagnoza astme z veliko verjetnostjo, vendar ne povsem, izključena. Negativni test pri izpostavljenem delavcu izključuje astmo (možno pa je, da na začetku bolezni bronhialna preodzivnost še ni prisotna).

Potrditev senzibilizacije za poklicni dejavnik:

- kožni test (kožni prick ali intradermalni vbodni test: pozitiven kožni vbodni test in/ali zvišane koncentracije specifičnih IgE ali IgG imonoglobulinov v serumu odražajo le izpostavljenost in/ali senzibilizacijo izpostavljenosti določenemu visokomolekularnemu in nekaterim nizkomolekularnim dejavnikom). Rezultati testiranja se odčitavajo po 15 do 20 minutah. Test je pozitiven ob pojavu urtike s premerom, večjim od 64 % premera kožnega testa s histaminom ob negativnem kožnem testu s fiziološko raztopino;
- pozitiven izvid kožnega testiranja brez drugih kliničnih dokazov bolezni ni dovolj za priznanje poklicne bolezni;
- in vitro test (dokaz celokupnih in specifičnih IgE protiteles v serumu; pozitiven rezultat sam po sebi ni diagnostičen za astmo). Določitev cirkulirajočih specifičnih IgE protiteles (reaginov) in specifičnih IgG protiteles (precipitini) se izvaja z imunokemijsko metodo (RAST). Prisotnost specifičnih IgE protiteles je dokaz senzibilizacije na določen alergen, prisotnost IgG protiteles pa je najpogostejše le odraz izpostavljenosti, ne pa tudi potrditev obstoječe senzibilizacije.

V diagnostičnem postopku poklicne astme izvedemo:

- usmerjen vprašalnik: delovna anamneza, klinični znaki v povezavi z delovnim okoljem...,
- spirometrijo z bronhodilatatornim testom, če je prisotna zgora dihal;
- meritve PEF,
- metaholinski test,
- (izjemoma) specifični bronhialni provokacijski test,
- inducirani sputum.

Specifični bronhialni provokacijski test je namenjen za dokazovanje specifičnega dejavnika iz delovnega okolja kot povzročitelja astme. Čeprav je dokaz absoluten, test redko izvajamo zaradi težke tehnične izvedbe. Opravimo le tiste, ki strogih pogojev komore z nadzorovanimi pogoji ne potrebujejo (npr. spajkanje, delo z moko, rezanje tekstila itd.).

Padeč FVC in FEV₁ za več kot 20 % glede na začetno (kontrolno) vrednost se ocenjuje kot pozitiven. Pozitiven test dokazuje povezanost bronhokonstriktorne reakcije z izpostavljenostjo določenemu senzibilizirajočemu agensu in je zlati standard za potrditev poklicne astme.

Negativen test z gotovostjo ne izključuje poklicne astme. Možno je, da ni bil izbran pravi dejavnik, nezadostna je lahko stopnja ali čas izpostavljenosti, lahko le neustrezen način izpostavljenosti ali pa gre za izgubo specifične odzivnosti, ker preiskovanec dalj časa ni bil izpostavljen vzročnemu dejavniku.

Lahko ga izvajamo tudi na delovnem mestu (s spremljanjem FEV₁ in PEF – pred delom in vsako uro med delom); pri tem je delavec izpostavljen realnemu delovnemu okolju, žal pa natančna identifikacija povzročitelja ni možna.

Metode naj ne bi izvajali zgolj iz medicinsko-pravnih razlogov, ker je lahko zelo nevarna.

Alergološka diagnostika

Pri dokazovanju poklicne astme nam je dokaz senzibilizacije samo v pomoč pri razkrivanju etiologije že dokazane poklicne astme. Tako pozitivni kot negativni test ne moreta zadoščati za potrditev ali izključitev poklicne astme. Pred nastopom dela ne priporočamo standardnega alergenskega testiranja, ker je dokazano, da verjetnost nastanka senzibilizacije za poklicne alergene pri atopiku ni pomembno večja kot verjetnost enakega dogodka pri zdravi osebi. Ta test tudi ne sme služiti kot izključitveni kriterij za sprejem na delovno mesto.

Kriteriji za postavljanje diagnoze poklicne astme so:

- obstaja inkriminirani agens, katerega iritativne, alergijske in farmakodinamske oziroma vnetne lastnosti so poznane;
- prikažemo povezanost astme z izpostavljenostjo poklicnemu alergenemu;
- simptomi se pojavljajo v glavnem in pretežno v času dela;
- stanje bolnika se izboljša, ko je izven delovnega mesta daljši čas.

Splošna navodila za diagnostični pristop pri poklicni astmi priporočajo naslednjo stopenjsko diagnostiko:

1. anamneza,
2. potrditev astme,
3. potrditev povezanosti bronhialne obstrukcije z delom,
4. potrditev preobčutljivosti za poklicni dejavnik, kar pa ni nujen pogoj za postavitve diagnoze poklicne astme,
5. potrditev vzročne vloge poklicnega dejavnika s specifičnim bronhialnim provokacijskim testom – kar je zelo redko izvedljivo, je pa zlati standard za diagnozo poklicne astme.

Stopenjski pristop k diagnostiki poklicne astme je naslednji:

1. sum na poklicno etiologijo,
2. zdravstvena in podrobna delovna anamneza,
3. raziskava vseh možnih vzrokov,
4. ocena tveganja delovnega okolja za ugotovitev vrste in stopnje izpostavljenosti,
5. nasvet delavcu, da ostane na delu, dokler diagnoza poklicne astme ni potrjena ali izključena, razen v primeru težke astme,
6. stopenjska klinična diagnostika,
7. ukrepi za prekinitev izpostavljenosti vzročnemu dejavniku po potrditvi diagnoze.

Dejavniki tveganja za poklicno astmo so predvsem atopija (predvsem pri izpostavljenosti visokomolekularnim dejavnikom, ne pa tudi pri izpostavljenosti nizkomolekularnim dejavnikom) in kajenje (povečana permeabilnost epitela v dihalih pri kadilcih omogoča lažji vstop alergenov). Pri izpostavljenosti nekaterim nizkomolekularnim vzročnim dejavnikom obstaja nasprotno pri kadilcih celo manjše tveganje za razvoj poklicne astme.

Pomembna razlika med poklicno in nepoklicno astmo je, da je poklicna ozdravljiva. Ob dovolj hitri diagnozi in premestitvi delavca na drugo, njemu neškodljivo delovno mesto lahko poklicna astma docela izzveni. Če ta čas zamudimo (po nekaterih podatkih 6 mesecev), poklicna astma perzistira in se rada prevesi v hudo perzistentno astmo, navzlic ustrezni premestitvi delavca (npr. podaljšane študije kažejo, da poklicna astma zaradi izpostavljenosti plikatični kislini, izocianatom ali drugim nizkomolekularnim snovem ostaja pri vsaj 50 % delavcev kljub spremembi delovnega mesta). Zato je zanjo izjemno pomembna zgodnja diagnoza. Če se nedvomno dokaže preobčutljivost delavca na določen alergen iz delovnega okolja, delavec ne more več delati v tem okolju, prav tako pa tudi ne sme biti izpostavljen drugemu snežibilizirajočemu agensu. Prav tako ne sme biti izpostavljen dražljivim snovem in ne sme delati v neugodnih mikroklimatskih pogojih (mraz, hitre spremembe temperature), ki lahko poslabšajo obstoječe stanje. Zato je potrebno iz delovnega procesa odstraniti alergeno snov (kar je zaradi samega tehnološkega procesa praktično nemogoče) ali pa zaposlenega odstraniti iz prostora, kjer je izpostavljen alergen.

Zdravljenje poklicne astme je povsem enako kot pri drugih oblikah astme.

V medicinski preventivi za delo v prahu moramo biti pri predhodnih pregledih še posebej pozorni na osebe, ki spadajo v skupino preobčutljivih (atopiki).

ALERGIJSKI ALVEOLITIS

(Farmerska pljuča)

Alergijski alveolitis je Arthusova – kasna precipitinska alveolarna pljučna reakcija, povzročena z inhalacijo organskega prahu rastlinskega ali živalskega izvora.

Alergijski alveolitis je vnetna granulomatozna reakcija alveolarnega in intersticijskega pljučnega tkiva po ponavljajočih se stikih s snovmi z antigenskimi potenciali. Lahko se razvije pri vseh, ki so izpostavljeni in ne le pri preobčutljivih (kot npr. pri razvoju alergijske astme pri atopikih).

Antigeni, ki povzročajo alergijski alveolitis, so najpogostejše organskega izvora. To so živalski antigeni: živalska dlaka, posebno lisičja in astrahan (krznarska pljuča) in iztrebki golobov ter drugih ptic (bolezen rejcev ptic).

Najpogostejši povzročitelji alergijskega alveolitisa so termofilne aktinomicete, gljivice, ki se razvijajo v toplih in vlažnih razmerah.

Farmerska pljuča (pljuča poljedelcev) so alergijski alveolitis, ki je nastal kot reakcija organizma na vdihane termofilne aktinomicete, kot na primer na *Micropolyspora faeni* iz plesnivega sena. Znanе so tudi druge klinične oblike alergijskega alveolitisa, kot npr. bolezen sirarjev (*Penicillium casei* iz plesnive skorje sira), gobarska pljuča (*Micropolyspora faeni* in *Thermoactinomyces vulgaris*) in pljuča pivovarjev (*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus* iz plesnivega ječmena in prahu slada). Čeprav so mislili, da alergijski alveolitis lahko povzroča le organski prah, je v zadnjem času vse več dokazov, da imajo to lastnost tudi neke kemične snovi, npr. toluen, diizocianati in bakrov sulfat.

Najpogostejše zbolevali so poljedelci, živinorejci, gozdarji, delavci v proizvodnji sladkorja, sira, v pražarnah kave in gojitelji ptic.

Klinična slika alergijskega alveolitisa, ki ga dostikrat zamenjujemo s prehladnimi stanji, je ne glede na vrsto alergena skoraj vedno enaka kot pri tako imenovanih **farmerskih pljučih**.

Če izpostavljenost prekinemo, reakcija pljuč hitro izzveni, če se ponovi, se spet pojavi. Stopnja simptomatike je odvisna od stopnje senzibilizacije - vse od blagih znakov prehlada pa do masivnega pnevmonitisa z akutno respiratorno insuficienco. Klinična slika je običajno zelo raznolika in je odvisna od stopnje senzibilizacije, masovnosti in pogostosti izpostavljenosti.

V razvoju bolezni razlikujemo tri faze:

Prvo fazo označuje akutni potek z naglim začetkom (6 do 10 ur po izpostavljenosti) s povišano temperaturo, tudi glavobolom in suhim kašljem ter anoreksijo. Traja nekaj dni in popolnoma izzveni.

V drugi fazi, ki je še reverzibilna in nastane po dveh do treh mesecih izpostavljenosti alergenu, pride do dispneje, cianoze in kašlja ter stalno subfebrilnih temperatur. Na pljučih ugotovimo drobna, nejasno omejena pegasta zasenčenja v srednjih in spodnjih pljučnih poljih.

V tretji fazi nastanejo v pljučih ireverzibilne difuzne fibrozne spremembe z emfizemom in bronhiektazijami (kot snežni meteži). Pljučno fibrozo spremlja zmanjšanje elastičnosti pljuč, to je restriktivna respiratorna insuficienca, in zmanjšanje difuzijske kapacitete za CO. S testiranjem z ekstraktom prahu, ki mu je delavec izpostavljen, se na koži lahko izzove kasna reakcija (rdečina in urtika na mestu testa v treh do šestih urah po aplikaciji antigena).

Obstaja nekajurna zakasnitev med izpostavljenostjo in razvojem simptomatike. Če preobčutljivost istočasno povzroči tudi 1. preobčutljivostni tip, pa le-ta bolnika opozori na škodljivost okolja. Včasih omogoči zgodnejšo diagnozo oziroma se bolnik prične izogibati tega okolja.

Bolezen se diagnosticira na podlagi mikronodularnih ali nodularnih senc na radiološki sliki pljuč in s prisotnostjo precipitinskih protiteles v krvi. V serumu ugotovimo velike količine protiteles proti sporam plesni. Raven precipitinov je odvisna od dinamike bolezni in je najvišja v akutni, pomembno pa se zmanjša v kronični fazi bolezni.

V zdravljenju se (pri večji prizadetosti) z uspehom uporabljajo kortikosteroidi.

V preventivi je pomembno skladiščenje krme, ki naj bo suha, priporočajo se ustrezne prezračevalne naprave, ki zmanjšujejo pregrevanje krme in vlažnost ter tako preprečijo nastanek in razvoj plesni.

Če se bolezen ugotovi, se mora bolnik izogibati vsake izpostavljenosti sporam plesni, in sicer ne le v hlevu, ampak tudi oblačil druge osebe, ki ima lahko spore.

Tudi v primerih, ko bolezen ne pušča trajnih posledic, je delovna zmožnost omejena, če se izpostavljenost inkriminiranemu alergenu ponavlja, ker je posledica vsakega ponovnega stika z njim porast protiteles in možni recidiv bolezni. Zato je sprememba delovnega mesta nujna.

Kontraindikacije za delo v območju organskega prahu so kronične bolezni zgornjih in spodnjih dihal in oči, specifična preobčutljivost, delavci z močno izraženimi deformacijami nosnega septuma in prsnega koša.

BOLEZEN REJCEV PTIC

Bolezen povzroča vdihavanje živalskih antigenov pri reji kokoši, rac, gosi, golobov in papagajev. Gre za beljakovinske delce, ki so v njihovem perju in iztrebkih. Količine teh beljakovinskih protiteles so največje pri čiščenju hlevov in kadar živali v tesnem hlevu povzročajo prašenje.

PRVA POMOČ IN UKREPI

Osnovna pravila prve pomoči:

	Vsakdo je dolžan po svojih zmožnostih pomagati
	Ukrepati je potrebno takoj
	Dati moramo prvo pomoč
	Poklicati moramo pomoč in reševalno službo (tudi za morebiten prevoz v bolnišnico)
	Odpeljati ponesrečenca v bolnišnico z vsemi previdnostnimi ukrepi z usposobljenim osebjem (samo izjemoma to storimo sami)

☎ POMEMBNE TELEFONSKE ŠTEVILKE ☎	
113	POLICIJA
112	CENTER ZA OBVEŠČANJE (splošna nujna medicinska pomoč, reševalci)
(01) 230 24 57	CENTER ZA ZASTRUPITVE KLINIČNI CENTER LJUBLJANA, ZALOŠKA CESTA 7

Kdor v nesreči pričakuje prvo pomoč od drugega, jo mora znati tudi pravilno dajati. Zato ne čakajmo zdravnika ali reševalnega avtomobila z zdravstvenim delavcem, ne da bi poprej ukrepali. Prva pomoč v nesreči je moralen ukrep, ki pomaga, da bo poškodovanec v kratkem času in v pričakovanem dobrem zdravstvenem stanju dobil potrebno strokovno pomoč.

Neposredno zdravstveno oskrbo poškodovanega ali nenadno obolelega ali akutno zastrupljenega na kraju dogodka in čim prej po dogodku, ki je opravljena z enostavnimi pripomočki in improvizacijo vzpostavi lahko tudi improvizirani transport, in ki traja toliko časa, dokler ne prispe strokovna pomoč ali dokler z bolnikom ne pridemo do ustrezne strokovne pomoči, imenujemo prva pomoč.

Od hitre in pravilne prve pomoči je marsikdaj odvisna usoda poškodovanega, nenadno obolelega ali zastrupljenega. S pravilnimi in pravočasnimi ukrepi prve pomoči lahko preprečimo zaplete enostavnih poškodb ali pa pri težjih poškodbah celo odločamo o življenju in smrti oziroma pomembno vplivamo na trajne posledice ali vsaj skrajšamo čas zdravljenja.

Razlikujemo več stopenj prve pomoči:

Laična prva pomoč je tista, ki jo da nestrokovnjak – laik. Osnovna načela te prve pomoči naj bi poznal vsak odrasel človek.

Polstrokovno prvo pomoč dajejo prostovoljni prvi pomaganci laiki, ki so se usposobili in izurili v posebnih tečajih prve pomoči, na primer v 20-urnih ali 80-urnih tečajih prve pomoči pri organizaciji Rdečega križa.

Strokovno ali medicinsko prvo pomoč pa dajejo zdravstveno izobraženi delavci. To pomoč, ki vključuje tudi zdravniško prvo pomoč, imenujemo tudi nujna medicinska pomoč.

Pojem prve pomoči zajema vse ukrepe, ki jih opravimo od trenutka, ko je človek poškodovan, do predaje poškodovanca medicinskemu osebju. Poškodovancu najpogosteje najprej pomaga nestrokovnjak z laično prvo pomočjo.

Prva pomoč je pogoj za uspešno zdravljenje in prvi, največkrat najpomembnejši člen v reševalni verigi.

Cilji prve pomoči na kraju nesreče so:

- ohraniti življenje,
- preprečiti poslabšanje zdravstvenega stanja,
- poskrbeti za strokovno pomoč.

Stanje poškodovanega ali obolelega se ocenjuje na osnovi vrste bolezni ali poškodbe in stabilnosti znakov življenja.

Vedno naj bi se uporabljal ABC pristop:

(seveda vedno najprej poskrbimo za lastno varnost)

nato:

- najprej preverimo stanje zavesti;
- če je nezavesten, kličemo na pomoč;
- preverimo prehodnost dihalnih poti (A – airway) in če dihalna pot ni prehodna, jo poskušamo sprostiti;
- preverjamo prisotnost dihanja (B – breathing) in če ga ni, telefoniramo na 112;
- pričnemo z zunanjo masažo srca (C – circulation) in umetnim dihanjem v razmerju 30 : 2
- in šele po vzpostavitvi osnovnih življenjskih funkcij ustavljanje krvavitve in nato;
- dokončamo celotno prvo pomoč.

Odraslim dajemo 30 stisov (masaž srca) s frekvenco 100/minuto in 2 vpiha z odmorom za izdih. Če je prisoten samo en reševalec in je verjeten vzrok poškodba ali utopitev ter ali je žrtev dojenček ali otrok, oživljamo vsaj minuto, preden gremo po pomoč. Če je žrtev odrasla oseba in ne gre za poškodbo ali utopitev, kličemo pomoč takoj, ko ugotovimo neodzivnost ali odsotnost dihanja.

Ukrepi

Pri prvi pomoči ukrepajte naglo, pravilno in v pravem zaporedju. Presodite svoje zmožnosti in okoliščine, zato ne poskušajte preveč. Uporabite spretnosti, ki temeljijo na znanju, usposobljenosti in izkušnjah.

V nezgodi pravilno ukrepate tako, da presodite okoliščine, pristopite k poškodovancu, ga pregledate, začnete (če je potrebno) s temeljnimi postopki oživljanja in pokličete reševalce.

Presodite okoliščine

Hitro in mirno ugotovite, kaj se je zgodilo. Preglejte okolje in položaj poškodovanca. Poiščite in presodite nevarnosti, ki bi lahko ogrozile vas in poškodovanca. Zavarujte poškodovanca na kraju nezgode. Nikoli se ne izpostavljajte nevarnostim! Zmeraj pogledjte, ali so v bližini ljudje, ki lahko pomagajo, in jih pritegnite k prvi pomoči.

Pristopite k poškodovancu

Mirno ga ogovorite. Pomirite ga s prijazno in sočutno besedo. Če se ne odzove, je najverjetneje nezavesten. Odstranite gledalce, svetovalce in radovedneže, ki ne sodelujejo in ne pomagajo v nezgodi.

Preglejte poškodovanca

Čeprav preiskava ni zdravniška, mora biti sistematična, hkrati pa zelo obzirna, da s tem ne prizadane poškodovanega ali ga celo izpostavimo posmehu. Kljub temu mora biti pregled odločen in temeljit. Le tako ugotovite vrsto in obseg poškodb.

Pokličite reševalce (nujna medicinska pomoč, reševalno vozilo z reševalci) (telefon 112).

Kadar ugotovimo nezavest, najprej sprostimo dihalno pot in nato preverimo prisotnost dihanja. Če žrtev ne diha, moramo poklicati splošno nujno medicinsko pomoč (SNMP tel. 112).

Kadar so v bližini ljudje, poprosimo najbližjega, da odide do telefona in pokliče pomoč. Če smo sami, moramo žrtev zapustiti in oditi do telefona. Izjema so že naštetje okoliščine, v katerih moramo oživljati eno minuto in nato šele zapustiti žrtev in oditi do telefona.

Dežurnemu dispečerju po telefonu številka 112 obvezno sporočimo naslednje podatke:

- kdo kliče (ime in priimek),
- kaj se je zgodilo (prometna nezgoda, razlitje vnetljive tekočine, uhajanje strupenega plina, eksplozija in vžig vozila),
- kje je nezgoda (natančen opis kraja),
- koliko je poškodovancev (hudih, lažjih),
- kakšno pomoč potrebujejo (število reševalnih vozil, spremstvo zdravstvenega osebja, reanimacijsko reševalno vozilo),
- počakamo, da klicani prekine zvezo, saj ima morda dodatna vprašanja.

Vsak poškodovanec potrebuje občutek varnosti in zaupanja v pomagala, zato moramo:

- obvladati sebe in dejavnike nezgode,
- ravnati mirno in premišljeno,
- z rokami prijemamo pazljivo, a hkrati čvrsto ter s poškodovancem govorimo, prijazno in odločno obenem.

Med pregledovanjem in oskrbo se moramo s poškodovancem ves čas pogovarjati:

- povedati moramo, kaj nameravamo storiti,
- na vprašanja poskušamo odgovoriti po pravici, ker s tem zmanjšamo bojazen; če ne poznamo odgovora, moramo to povedati,
- tudi po končani oskrbi se moramo s poškodovancem še naprej pomirjujoče pogovarjati,
- poškodovanca, za katerega mislimo, da bo umrl, ne smemo nikdar puščati samega.

Dajanje prve pomoči je lahko nevarno, zato moramo vedno paziti na lastno varnost. Poskusi junaškega ravnanja v tveganih okoliščinah ogrožajo našo lastno varnost.

Prvi pomagalci so lahko zaskrbljeni tudi zaradi možnosti, da bi jih poškodovanci okužili s hudimi nalezljivimi boleznimi (osebna varovalna oprema!).

KRVAVITEV

Krvavitev je odtekanje krvi iz žil ali srca navzven, v telesne votline ali tkiva. Nevarna je pri ranah in topih poškodbah v globini telesnih votlin ali okončin. Krvavitev je navadno posledica delovanja sile in raztrganja tkiva, lahko pa so vzrok krvavitve tudi različne bolezni: motnje v strjevanju krvi, razjeda na želodcu, krčne žile itd.

Organizem ima naravne mehanizme za ustavljanje krvavitve: poškodovana žila se skrči, krvni tlak se zaradi krvavitve zniža, strdek zamaši žilo. Pri hudih krvavitvah naravni mehanizmi ne zadoščajo, človek lahko izkrvavi iz velikih žil v zelo kratkem času.

Pri ranah lahko pride do zunanje krvavitve. Pri notranji krvavitvi odteka krvi v telesne votline, votle organe ali tkiva. Notranja krvavitev, ki jo povzroči topa poškodba, je nevidna. Ugotoviti jo je težko, včasih šele, ko je prizadeti že izgubil mnogo krvi. Nevidna (skrita) krvavitev je najpogostejša pri zlomih kosti (če se zlomita obe kosti goleni, se nabere ob zlomu okrog pol litra krvi, pri zlomu stegenice znaša izguba krvi do 2 litra, pri zlomu medenice pa lahko celo do 5 litrov) in krvavitvi v prsno ali trebušno votlino.

Krvavitev je lahko arterijska (iz žil odvodnic – svetlejše rdeča kri, ki intenzivno – v curku pulzirajoče odteka), venska (iz žil dovodnic – temnejša rdeča kri, ki odteka počasneje, brez curka, enakomerno in ne pulzira) ali kapilarna (iz žil lasnic – kri le rosi). Pri poškodbah je krvavitev ponavadi mešana, ker hkrati krvavijo arterije, vene in kapilare.

Znamenja hude izgube krvi:

- močna bledica kože, predvsem na uhljih in vidnih sluznicah, predvsem na ustnicah in na notranji strani vek,
- hladna in lepljiva koža,
- pospešeno dihanje in lovljenje sape, pogosto tudi zehanje,
- pospešen ali hiter in slaboten utrip žile,
- nemir,
- utrujenost, žeja in slabost,
- občutek omedlevice,
- šumenje in zvonjenje v ušesih,
- megla in tema pred očmi, posebno, če se poškodovanec dvigne,
- strah.

Prva pomoč pri krvavitvi

Krvavitev morate ustaviti čim prej in poškodovanca predati reševalcem nujne medicinske pomoči. Pri prvi pomoči ustavite krvavitev samo zasilno ali začasno, vendar s tem večkrat rešite življenje. Notranje krvavitve ne morete ustaviti s sredstvi laične prve pomoči. V tem primeru poskrbite za hiter in obziren prevoz v kirurško ustanovo. Vensko krvavitev ustavimo z dvigom krvavečega dela in zmerno zažeto kompresijsko obvezo.

Krvaveča razjeda goleni preneha krvaveti, če ležečemu bolniku dvignemo nogo za 45 stopinj od podlage. Kapilarna krvavitev preneha navadno sama od sebe.

Zasilna ustavitev krvavitve je temeljni ukrep prve pomoči za reševanje življenja. Manjša krvavitev navadno preneha sama po sebi. Pri hudih krvavitvah naravni mehanizmi ne zadoščajo, zato poškodovanec izkrvavi iz velikih žil v zelo kratkem času. Tudi na drugih delih telesa ustavite hudo krvavitev iz rane tako, da nanjo takoj pritisnete v več plasti zložen robec ali gazo. Na zloženo tkanino morate močno pritiskati s štirimi prsti.

Količina krvi, ki jo človek sme izgubiti brez nevarnosti za življenje, je v raznih primerih in okoliščinah različna.

Skupna količina krvi pri odraslem človeku je 7 do 9 odstotkov telesne mase, kar znaša okoli 5 litrov krvi. Pol litra krvi lahko izgubimo brez škode za zdravje, to je tudi količina, ki jo damo pri transfuziji.

Že nenadna izguba enega litra krvi lahko privede do znamenj šoka ali pa je celo smrtna pri tistih, ki so bili že prej slabokrvni, izčrpani, stari in bolni. Mlad zdrav človek lahko preživi ob ustrezni pomoči tudi izgubo dveh do treh litrov krvi. Pri otrocih je nevarna količina izgube seveda ustrezno manjša, zato moramo vsako, tudi majhno krvavitev takoj zasilno ustaviti.

Zelo hude krvavitve iz arterije (predvsem iz predelov, kjer močne žile zapuščajo trup: vrat, pazduha ali noge), ko svetlo rdeča kri brizga iz rane v curku, najlaže in najhitreje začasno ustavite, če pritisnete v rano s prsti preko gaze ali pa tudi brez nje. Pritisk moramo vzdrževati do predaje poškodovanca kirurgu. Od strokovnih ukrepov pride v poštev še čvrsta tamponada rane in dodaten pritisk čez tampon. To velja predvsem za krvavitve, kjer res ne moremo izgubljati časa, sicer bo poškodovani izkrvavel na mestu nezgode. Vse druge krvavitve navzven lahko ustavimo z digitalno kompresijo, to je s pritiskom na žilo ob kost med srcem in krvavečim mestom..

Neposreden pritisk s prsti zadovoljivo nadomestite pozneje s kompresijsko obvezo.

Pri odtrganih udih in hudo krvavečih zmečkaninah izjemoma namestite arterijsko (Esmarchovo) prevezo uda.

Kompresijska obveza

S kompresijsko obvezo, ki tesno pritiska na rano in samo mesto krvavitve, ustavite večino krvavitev na glavi, trupu in udih.

Kompresijsko obvezo namestite takole:

- dvignete poškodovani ud in pritisnete na žilo med srcem in krvavečim mestom;
- pokrijte rano s sterilno kompresjo iz gaze ali z blazinico prvega sterilnega povoja;
- čvrsto pritisno blazinico položite na rano čez sterilno gazo. Za pritisno blazinico lahko uporabite nerazvit povoj;
- pritisno blazinico pritrdite s povojem (čvrsti krožni zavoji);
- opazujte barvo kože in utrip arterije na ud;
- imobilizirajte ud.

Ko namestite kompresijsko obvezo, čez nekaj minut prenehajte pritiskati na žilo. Kadar obveza ne prekrvavi v petih minutah, je bila krvavitev uspešno ustavljena. Če obveza prekrvavi, obnovite kompresijsko obvezo v celoti. Pri vseh hudih krvavitvah znova preglejte kompresijsko obvezo vsakih 5 do 10 minut. Če je obveza nameščena pretesno, koža pomodri (z obvezo smo stisnili vene), pobledi (z obvezo smo stisnili tudi vse arterije) in se ohladi. S tem smo s kompresijsko obvezo napravili prevezo uda in če jo pustimo nezrahljano več kot dve uri, bo ud odmrl.

Arterijska (Esmarchova) preveza uda

Namestite jo le izjemoma, ko hude krvavitve ne morete ustaviti s kompresijsko obvezo (pri odtrganinah, hudo krvavečih obsežnih zmečkaninah, hudo krvavečih odprtih zlomih) ali v izjemnih okoliščinah (pri reševanju ob katastrofah) kot začasno metodo tudi pri drugih krvavitvah, vendar jo moramo čim prej nadomestiti s kompresijsko obvezo, ko bosta reševalec in poškodovanec na varnem. Največkrat je nameščena po nepotrebnem ali nepravilno, tako da več škoduje kot koristi. Je silno boleča in zato pospešuje ali celo povzroča šok. Na mestu pritiska okvari kožo, mišice in živce in lahko povzroči odtujevanje uda, če je zavezana predolgo.

Za prevezo uda uporabite trikotno ruto ali kravato, zloženo v 5 centimetrov širok trak, ali gumijast ali elastičen trak. Kožo pod prevezo morate zavarovati s plastjo gaze ali podobne tkanine. Ruto ali trak dvakrat ovijte okoli uda, zavežite konce, pretaknite paličico in jo obračajte, dokler se krvavitev ne ustavi. Nato s povojem ali z drugo ruto pritrdite paličico, da ne popusti pritisk na krvavečo žilo. Ne uporabljajte ozkih trakov ali vrvic, ker se zarežejo v kožo in mehke dele ter jih poškodujejo. Posebno nevarno je, če se pri tem poškodujejo živci.

RANE

Vsako prekinitev kože imenujemo rana. Rane razvrščamo po obliki in nastanku (praske, odrgnine, vreznine, udarnine, zmečkanine, raztrganine, vbodnine itd.).

Razne vrste ran imenujemo po njihovi obliki in načinu nastanka.

Praske in odrgnine so površinske rane, ki nastanejo, če se odrgnemo ali opraskamo ob trdem ali robatem predmetu.

Vreznine in vsekanine so lahko po globini zelo različne. Takšne rane povzroči ostrina noža, sekire, žage ali stekla.

Zmečkanine nastanejo zaradi topega udarca, stiska ali zmečkanja. Lahko so globoke ali pa le povrhnje.

Raztrganine so najpogostejša vrsta rane. Povzroči jih robat predmet pri padcu ali udarcu. So lahko različno globoke. Zelo hude raztrganine prizadenejo razni stroji in orodja. Pogosto je ista rana hkrati raztrganina, udarnina in zmečkanina.

Ugriznine so rane po ugrizu psa, mačke, konja ali drugih živali, včasih tudi človeka.

Vbodnine prizadenejo osti, igle, žebli, bodala itd. Navadno so globoke, neredko segajo v telesne votline (npr. v prsno ali trebušno votlino). V takih primerih je rana na koži majhna, na notranjih organih pa lahko globoka in nevarna (Predmetov nikoli ne odstranjujte iz vbodnih ran!).

Strelnine (oplazna rana, prestrel, zastrel) nastanejo zaradi projektila iz puške ali pištole, pa tudi od drobcev bombe ali mine. Te rane so pogosto zelo globoke ali potekajo celo skozi glavo, trup ali ud. Projektil z veliko začetno hitrostjo ima večjo izstopno kot vstopno rano, kar je pomembno pri proučevanju nastanka poškodbe in poti izstrelka.

Rana je nevarna zaradi krvavitve in okužbe. Vreznine in vbodnine so nevarne predvsem zaradi krvavitve, raztrganine, zmečkanine in vse globoke rane pa zaradi okužbe. Okužba ali infekcija rane je naselitev in razmnoževanje bakterij v rani.

Prva oskrba rane

Odkrijte ranjeni del telesa tako, da vidite vso rano, rane pa se ne dotikajte.

Po zaustavitvi krvi rano prekrijte s sterilno tkanino, to pa pritrdite s povojem ali ruto. Bolje je, da rane ne obvežete, kakor da bi jo okužili z nečisto obvezo.

Krvavitev ustavite s kompresijsko obvezo ali z drugim naučenim postopkom.

Pri hudih ranah naj poškodovanec leži. Bodite pozorni na znake šoka. Nezvestnega namestite v stabilen bočni položaj.

Ranjeni deli telesa morajo mirovati, zato ranjene ude imobiliziramo na zasilni način ali z ustrezno posebno opornico. Imobilizacija ublaži ali celo odpravi bolečine, preprečuje povečanje krvavitve ali nove krvavitve in preprečuje širjenje infekcij.

Rano naj dokončno oskrbi zdravnik v prvih šestih urah po poškodbi. Kasneje je verjetnost infekcije navadno prevelika, zato takšne »zamujene« rane pustijo odprte in je zato celjenje bistveno daljše in tudi brazgotina bistveno večja.

Obvezovanje ran

Rano prekrijte s sterilno obvezo. Pri prvi pomoči ne razkužujte ne rane ne njene okolice. Rane ne umivajte in izpirajte z vodo, zlasti, če je globoka. Izjema pri tem osnovnem pravilu so ugriznine in res samo povrhnje praske, odrgnine ali vreznine, ki ne segajo do podkožja. Iz rane ne poskušajte pobirati tujkov ali odstranjevati strdkov krvi. Za obvezo rane je najprimernejši sterilni prvi povoj z eno ali dvema blazinicama. Rano lahko pokrijete tudi z več plastmi sterilne gaze. Vate nikoli ne polagajte neposredno na rano, ker se nanjo prilepi.

Kadar je rana zelo obsežna, je za obvezo najprimernejša sterilna gaza z več plastmi. Gazo pritrdite z navadnim povojem ali s trikotno ruto.

Navodila pri prvi oskrbi rane

Rane ne umivaj in izpiraj z vodo, zlasti če je globoka.

Z vodo lahko v globino in stranske žepe rane занeseš bakterije s površine rane in z okolne kože.

Izjema pri tem osnovnem pravilu so ugriznine in res samo povrhnje praske, odrgnine in vreznine, ki ne segajo do podkožja. Seveda samo tam, kjer imaš čisto tekočo vodo (ali prekuhano vodo).

V rano ne vlivaj nobenega razkužila: ponavadi bolj škoduje rani in poškodovancu kakor bakterijam.

Ne posipaj ran s praškom.

Ne dajaj na rano nesterilnih mazil.

Ne pobiraj in ne izdiraj iz rane tujkov, zlasti ne, če so globoko in čvrsto zapičeni. To bo mnogo varneje in bolje opravil zdravnik! Iz rane odstranimo le manjše tujke, ki jih v celoti lahko odstranimo (npr. manjše igle, ki se niso zlomile ipd.).

ZASTRUPITVE

Kdaj posumimo na možnost zastrupitve?

Pri izpostavljenosti strupu in če se pri sicer zdravi osebi pojavi katerikoli od teh znakov:

- zmedenost, nezavest, krči;
- slabost, bruhanje, driska, bolečine v trebuhu;
- težko dihanje, dušenje, slinjenje, kašelj;
- ohromelost, nehoteni gibi;
- bledica, pordelost kože, potenje;
- neredni srčni utrip.

Za akutne (nenadno nastale) zastrupitve je značilno hitro spreminjanje klinične slike (znakov zastrupitve), bodisi izboljšanje ali poslabšanje.

Le redke zastrupitve potekajo »tipično«, kot je navedeno v učbenikih. To zlasti velja za zelo blage in zelo hude zastrupitve, za kombinirane (kjer se učinek več strupenih snovi lahko kombinira, oslabi ali potencira in spremeni klinično sliko) in za zastrupitve pri bolnikih s predhodnimi hudimi obolenji. Zato vsaka zastrupitev pomeni nekakšen unikat.

Zastrupitve so pogoste pri duševnih bolnikih, neredko so povezane tudi s poškodbami, podhladitvijo in nekaterimi motnjami presnove, kar vse vpliva na klinično sliko.

Potek zastrupitve in usoda zastrupljenca se pogosto odloča v prvih minutah (cianidi, jedke snovi) ali urah po zastrupitvi.

Poznavanje ukrepov in njihovo pravilno zaporedje lahko reši življenje, omili posledice ali skrajša zdravljenje!

Nujne ukrepe prve pomoči morajo poznati tudi laiki!

V najkrajšem možnem času poskušamo zbrati ključne podatke o zastrupljeni osebi, strupu in okoliščinah zastrupitve.

Čim prej pridobimo podatke od zastrupljene osebe (v kratkem času lahko izgubi zavest!).

Odgovori na ta vprašanja pomagajo pri odkrivanju vzroka zastrupitve, pri pravočasnem zdravljenju in lahko pripomorejo k boljšemu izidu bolezni in pomagajo pri odkrivanju drugih potencialnih zastrupljenцев (množične zastrupitve).

Škodljivo delovanje strupa je odvisno od	
<u>lastnosti strupene snovi</u>	<u>človekovih lastnosti</u>
katera strupena snov (njene lastnosti) je vzrok zastrupitve	aktivnosti človeka (večja aktivnost – večja hitrost dihanja in večja količina vdihanega zraka in s tem strupov)
količine in koncentracije strupene snovi (ter fizikalnega in kemijskega stanja strupa)	splošnega psihofizičnega počutja (zdravja)
časa izpostavljenosti	stanja kritičnega organa oz. organskega sistema, ki ga strup prizadene
	pa tudi vseh ostalih lastnosti ponesrečenca (starost, spol, telesna masa ...)

Ukrepi ob zastrupitvi

- poskrbimo za lastno varnost,
- odstranitev iz nevarnega območja,
- ocena stanja (zavest, dihanje, utrip srca), bočni položaj nezvestnega, sprostitev dihalnih poti,
- klic reševalcev 112,
- ABC oživljanja – vzpostavitev osnovnih življenjskih funkcij,
- dekontaminacija (odstranitev strupa),
- prepoznavanje strupa, iskanje specifičnih zdravil – antidoti,
- pomoč pri pripravi za transport in zbiranju dokumentacije,
- preprečevanje nadaljnje škode.

Laik naj ne bi izvajal prve pomoči v kontaminiranem območju, pač pa le ustrezno usposobljen zdravstveni tehnik ali zdravnik. Ob ustreznem zavarovanju (in osebni varovalni opremi) naj bi le-ta začel z oživljanjem že v samem kontaminiranem območju.

1. Osebna varnost in evakuacija

- Zelo pomembna je osebna varnost in zaščita reševalcev. Pazi na:
- maske,
- rokavice,
- nevarna mesta: cisterne, silosi, vinske kleti, garaže,
- požar,
- prekinitev izpostavljenosti (!).

2. Ocena stanja zastrupljenca

Zavest, dihanje, utrip srca.

Nezavestnega bolnika, ki diha, damo v položaj na levi bok (sprostitev dihalnih poti). Hkrati v primeru bruhanja preprečimo, da bi izbruhane mase prišle v pljuča – aspiracija – in povzročile zaplete, npr. pljučnico.

3. ABC oživljanja

Pri osebi, za katero ugotovimo, da ne diha in ima zastoj srca, začnemo temeljne postopke oživljanja (že opisano).

4. Dekontaminacija (odstranitev strupa)

- Dekontaminacija kože: odstranimo kontaminirana oblačila, kožo izpiramo z vodo in navadno milnico,
- izpiranje oči: čista voda ali fiziološka raztopina, vsaj 10 minut,
- odstranitev strupa iz ust: spiranje z vodo, mehanska odstranitev strupa,
- razredčenje strupa z vodo (spiti po požirkih 50–100 ml navadne vode); NE dajemo mleka, milnice, kisa, alkohola ...
- eliminacija – odstranjevanje strupa iz telesa,
- dekontaminacija prebavnega trakta – odstranjevanje strupa iz prebavil pred prehodom v kri,
- (izzivanje bruhanja, če je zastrupljeni pri zavesti in če ni šlo za zaužitje jedkovine (kisline, lug), aktivno oglje (30 g – 2 žlici naenkrat v razmaku 1 ure)),
- izpiranje želodca – izvaja zdravnik,
- bruhanja poleg zastrupitve z jedkovinami ne smemo izzivati tudi pri motnjah zavesti, pri zastrupitvah, kjer v kratkem času pričakujemo spremembo zavesti, v nosečnosti, pri nekaterih bolezenskih stanjih (npr. srčnem popuščanju, nagnjenju h krvavitvam, zelo visokem krvnem tlaku) in pri strupih, ki povzročajo krče.

5. Identifikacija strupa in antidoti

Šele ko smo poskrbeli za osnovne življenjske funkcije (dihanje, delovanje srca) in dali nezavestnega zastrupljenca v položaj nezavestnega, ugotavljamo vzrok zastrupitve:

poiščemo embalažo (deklaracija, navodila za uporabo),

zberemo tudi morebitne vzorce za toksikološke analize (izbruhane mase, urin – 20 ml)

Dajemo antidote.

Antidoti so snovi, ki s svojim delovanjem nevtralizirajo ali inaktivirajo strupe in njihove presnovke ali zavirajo učinek strupa z nasprotnim delovanjem. Po načinu delovanja jih razvrščamo v fizikalne (adsorbenti – aktivno oglje), kemične (helatorji, na katere se vežejo težke kovine) in fiziološki (atropin, naloksan). Glede na veliko število strupov imamo na voljo razmeroma malo antidotov. Učinkovite antidote uporabljamo le za manj kot 5 odstotkov vseh zastrupitev. Antidoti ne morejo nadomestiti nekaterih drugih nujnih ukrepov, npr. vzpostavitev vitalnih funkcij (prva pomoč) in nujno simptomatično zdravljenje (v nadaljnji oskrbi zastrupljenega). Tudi antidoti so lahko toksični, če jih damo neustrezno ali nepravilno doziramo, zato specifične antidote daje le primerno izobražen zdravnik.

Najpogosteje uporabljamo naslednje antidote:

- kislina – voda,
- lug – voda, razredčen kis, če je pri roki (vendar le pri lokalnih – površinskih poškodbah z lugi, nikakor pa ga ne dajemo piti npr. pri zaužitju luga),
- metanol – etanol (100 ml 40 % žganja),
- morfij – nalorfin 10 mg i.v.,
- organofosfati – atropin 3 do 5 mg,
- cianidi – kalcijev edetat 1 do 2 mg.

Pri prometu z nekaterimi zelo strupenimi kemikalijami mora biti dostopen ustrezen antidot na delovnem mestu ali v zdravstvenem zavodu (cianidi, HF).

6. Prevoz in dokumentacija

- Poskrbeti za ustrezen transport v zdravstveno ustanovo (predhodni posvet z zdravnikom).
- Zbiramo dokumentacijo o bolniku, strupu, okoliščinah zastrupitve, stanju bolnika.
- V sumljivih primerih moramo obvestiti pristojne organe (policijo, kriminaliste, inšpekcijo).

7. Preprečevanje nadaljnje škode

- Preprečimo nadaljnjo zastrupitev (evakuacija potencialno ogroženih, dekontaminacija okolja).
- Preprečimo onesnaževanja okolja.

Osem ključnih vprašanj pri zastrupitvi

Najprej je potreben izčrpen pogovor z zastrupljencem, njegovimi sodelavci, svojci oziroma očividci, predvsem v primeru, ko pogovor z zastrupljencem ni možen. Zelo pomembni so tudi podatki iz zastrupljenčeve zdravstvene dokumentacije (njegovega osebnega zdravnika, ki nam lahko razkrijejo pomembne podatke o njegovi predhodni obolevnosti, zdravljenju itd.) in podatki delovnega okolja o obremenitvah in škodljivostih oziroma tveganjih v celoti iz opravljene ocene tveganja (tudi rezultati ekološkega, biološkega in epidemiološkega monitoringa).

- Kdo je zastrupljeni?
- Kateri strup je vzrok zastrupitve?
- Koliko strupa je bolnik zaužil in kako dolgo je bil v stiku z določenim strupom?
- Kdaj je prišlo do zastrupitve?
- Kako je strup vstopil v telo?
- Kje je prišlo do zastrupitve in kje so našli zastrupljenca?
- Zakaj se je nekdo zastrupil (nesreča, samomor, umor)?
- Kakšen je bolnik, kako se stanje zastrupljenca spreminja?

KDO

- ime, starost, naslov;

KATERI STRUP

- iskati podatke o strupu: embalaža, škatlice, steklenice, razlita tekočina, varnostni list, okoliščine,
- ostanek strupa in embalažo priložimo k dokumentaciji, ki spremlja zastrupljenca v zdravstveno ustanovo;

KOLIKO STRUPA

- volumska ocena (požirki, žlice, mililitri), ocena mase (število tablet, zrn, miligrami),
- koncentracija in čas izpostavljenosti pri plinih;

KDAJ

- čas zaužitja oziroma izpostavljenosti, trajanje izpostavljenosti, čas prenehanja izpostavljenosti,
- ti podatki so pomembni pri oceni faze zastrupitve;

KAKO

- z vdihavanjem, zaužitjem, skozi kožo, z vbrizganjem;

KJE

- na delovnem mestu: v delavnici, v skladišču, laboratoriju ...
- v domačem okolju: v stanovanju, garaži, silosu ...
- ali je morda ogroženih še več oseb?

ZAKAJ

- nesreča pri delu, zastrupitev po pomoti, zloraba, samomorilni namen, zastrupitev po tretji osebi;

SPREMEMBE STANJA

- kakšen je bil zastrupljenec, ko smo ga našli (zavest, dihanje, pulz, bruhanje, barva kože, znojenje, bolečine ...),
- kako se je stanje zastrupljenca s časom spreminjalo (spremembe opisanih simptomov).

Zelo pomembni so še naslednji postopki:

- odvzem materiala za toksikološko analizo – kemični dokaz zastrupitve (urin, kri ali drug material: izbruhanina),
- pri napotitvi zastrupljenca k zdravniku priložimo potreben opis okoliščin, ostankov strupov, embalažo, prospekte – VARNOSTNI LIST,
- pri sumu na poskus samomora moramo bolnika po končani obravnavi (SNMP-splošna nujna medicinska pomoč) in pri toksikologu ... skupaj s svojim napotiti še k psihiatru,
- pri nezgodi na delu moramo obvestiti tudi varnostnega inženirja oziroma drugo odgovorno osebo.

Zastrupitve z jedkovinami

Jedkovine so snovi, ki v stiku s kožo ali sluznicami povzročijo neposredno lokalno poškodbo tkiva. Izraz "jedkovina" uporabljamo za luge, kisline in njihove soli. Izraz "kavstik" uporabljamo le za lužnine oziroma alkalne substance ali baze. "Koroziv" je vsaka snov, ki direktno poškoduje tkivo, ne glede na kemično sestavo in kislost, npr. fenoli, organska topila, parakvat in fosfor.

Jedkovine delimo v dve skupini:

Kisline

- *anorganske*: klorovodikova, žveplena, dušikova, fosforna, fluorovodikova, borova, cianovodikova kislina itd.,
- *organske*: mravljična, očetna, mlečna, trikloroacetna, fenol, salicilna, oksalna kislina itd.,
- *kisle soli*: amonijev klorid, živosrebrov diklorid itd.

Kemično so organske kisline sicer šibke, imajo pa lahko enak učinek razjedanja ali razkrajanja kot anorganske. Večina organskih kislin ima še izrazit učinek na vse telo (ki ga imajo tudi nekatere anorganske kisline: borova in cianovodikova).

Lugi (alkalijske oz. baze)

- kalijev, natrijev, kalcijev, amonijev in drugi hidroksidi,
- alkalne soli: natrijev in kalijev karbonat, kalijev permanganat, natrijev borat, natrijev hipoklorid in druge.

Zastrupitve so včasih posledica neprevidnosti ali nezgod (zamenjava steklenic). Nekdaj pogoste zastrupitve z jedkovinami s samomorilnim namenom so postale redke.

Uporaba jedkovin je zelo široka: v industriji (višje koncentracije – industrijska čistila so na splošno bolj koncentrirana), kmetijstvu, farmaciji, zdravstvu in tudi v gospodinjstvu (čistila, sredstva proti rjavenju, praški, belila itd.).

Do zastrupitve pride lahko z vdihavanjem, zaužitjem, skozi kožo in oči. Vdihavanje jedkovin povzroča vnetja zgornjih dihal, v hujših primerih vnetno reakcijo v pljučih in nabiranje vode v pljučih. Znaki na pljučih lahko nastanejo po obdobju brez težav, ki lahko traja do 24 ur.

Kislina v stiku s kožo in sluznicami povzroča koagulacijski tip nekroze (odmrtnje tkiva). Na koži povzroča trdo, suho in nagubano skorjo, ki kožo izsuši. Proces nekroze se hitro omeji in ne napreduje v globino. Zaradi odstopanja odmrlega tkiva pride ob zaužitju kisline lahko do globokih razjed s predrtjem stene požiralnika ali želodca z zakasnitvijo nekaj dni. Prizadeta koža ali sluznica sta rjavkastočrno obarvani, razen pri dušikovi in pikrinski kislini, kjer sta rumene barve.

Alkalijske v stiku s kožo in sluznicami povzročajo kolikvacijski tip nekroze, vežejo se z beljakovinami in maščobami. Koža postane vlažna, sluzasta, razmehčana in nabrekla. Lokalna poškodba tkiva je sicer takojšnja (zmehčanje kože), vendar proces nekroze napreduje v globino še dva do tri dni. Šele po štirih do sedmih dneh se začne razmejevati odmrto tkivo, čemur sledi obnova poškodovanega tkiva. Zato je največja nevarnost za globoke razjede s predrtjem zgornjih prebavil v prvih sedmih do enaindvajsetih dneh. Prizadeta koža ali sluznica sta sprva videti milnato bele barve, kasneje rumenorjave.

Pri opeklinah kože z jedkovinami je treba te snovi čim prej odstraniti. Speremo jih z obilnimi količinami vode. Najprej s primerno krpo jedkovino popivnemo (ne razmažemo, niti ne drgnemo). Nato spiramo z vodo in eventuelno blagim nevtralizacijskim sredstvom (razredčen kis, milnica), ponovno speremo, posušimo in sterilno obvežemo ter imobiliziramo. Poškodovani mora čim prej priti do zdravnika.

Z vodo strup razredčimo in obenem odstranimo, hladna voda pa deluje tudi protivnetno. Takoj moramo odstraniti tudi vso kontaminirano obleko in obutev. Nevtralizacija s kemičnimi protistrupi je zamudna in nevarna zaradi toplote, ki se sprosti pri reakciji kisline in luga, kar lahko povzroči le še dodatno okvaro.

Zaužitje jedkovine povzroči različne stopnje opeklin po sluznicah ustne votline, žrela, požiralnika in želodca. Pojavi se huda bolečina v ustih, žrelu, za prsnico in v trebuhu, močno slinjenje, težko požiranje, bruhanje krvnih mas itd. Običajno so vidne spremembe okrog ust in v ustni votlini. Razvijejo se glasno dihanje, hripavost in težka sapa. Pri razjedi oz. prejedi požiralnika in/oziroma želodca so prisotni znaki vnetja v prsni votlini in/ali trebušni votlini ter znaki šoka. V kasnejši fazi pride posledično do povezav med požiralnikom in sapnikom ali aorto, krvavitev iz prebavil, brazgotinjenja požiralnika ali želodca ipd.

Najznačilnejši pojavi po zaužitju jedkovine so:

- huda bolečina v prsih in trebuhu,
- bruhanje, včasih tudi driska,
- pogosto se pojavijo znamenja šoka.

Kakšna so znamenja in posledice, je odvisno od tega, koliko jedkovine je kdo zaužil in v kakšni koncentraciji, kakšen je pH, moč jedkovine, čas izpostavljenosti in načina vnosa.

Navadno ni težko ugotoviti, za kaj gre. Okoliščine, psihično stanje bolnika, steklovina in kozarec z odpadki jedkovin ipd, hitro razjasnijo položaj. Lugi in kisline lahko povzročijo naglo smrt, večinoma pa hude opekline po požiralniku in želodcu, ki zahtevajo težavno in dolgotrajno zdravljenje.

V prvi pomoči čim prej in čim bolj razredčimo jedkovino, navadno najhitreje z vodo. Zastrupljenec naj, če je priseben, popije dva kozarca vode, največ 50 do 100 ml (ne več, sicer lahko bruha) naenkrat. Večje količine vode naenkrat lahko povzročijo prehod strupa v dvanajstnik. Ne smemo dajati gaziranih pijač, ker sproščanje ogljikovega dioksida povzroča razširitev želodca in poveča nevarnost za razpok. Mleka ne dajemo, ker pospeši vsrkanje strupov, ki so topni v maščobah. Priprava kislih raztopin za nevtralizacijo lugov in obratno je zamudna in nevarna zaradi sproščanja toplote pri sami reakciji. Ne smemo mu dajati kemičnih nevtralizacijskih sredstev v obliki blagih kislin ali alkalij. Bolnika čimprej prepeljemo v bolnišnico. Pri zastrupitvah s kislinami in lugi ne izzivamo bruhanja, ker je zaradi razjedene sluznice želodca in požiralnika nevarno, praviloma tudi ne izpiramo želodca (razen, če je minilo od zaužitja jedkovine manj kot 10 minut) zaradi nevarnosti razjede s predrtjem in vdihanja želodčne vsebine. Prav tako ne dajemo aktivnega oglja.

Kemična poškodba očesa (z jedkovinami – kislinami in lugi) je zelo nevarna, in če ni hitre in pravilne pomoči, poškodovanec lahko oslepi. Kemične poškodbe s kislino so redke (primerijo se, če pri delu kislina brizgne v oko). Bolj pogoste so poškodbe očesa z lužnatimi snovmi, predvsem z živim ali gašenim apnom, ki brizgne v oko pri zidanju. Tudi poškodbe s koncentriranimi detergenti spadajo med poškodbe z lužnatimi snovmi. Poškodbe z lugi so nevarnejše zaradi prodiranja lužine v globino in kolikvacijske nekroze očesnih delov.

Pri kemičnih poškodbah očesa je na koži vek vidna nekroza, vendar so glavne spremembe na veznici in roženici. Veznica je bleda, nabrekla, podobna trdo kuhanemu beljaku. Na roženici je uničen epitel, in ko jedkovina prodira v globino, tudi roženica postane bela, neprozorna, podobna kuhanemu beljaku. Oko se močno solzi in zelo pekoče boli.

Pri teh poškodbah je pomembna res hitra prva pomoč. Kemikalijo je potrebno čim prej močno izprati iz očesa z vodo. Ker z vsako sekundo napreduje proces nekroze (odmiranja tkiva), z izpiranjem z vodo kemikalijo takoj razredčimo ter s tem zmanjšamo delovanje v globino. V prvi samopomoči poskušamo jedkovino izprati sami s pomočjo posebnih fontan, kjer z nogo sprožimo curek vode navzgor v oko, ki ga poskušamo razkleniti. Če fontane ni v prostoru ali očesa zaradi močnega draženja ali bolečine ne moremo razpreti, je nujna takojšnja pomoč reševalcev.

Poškodovanec naj se uleže na hrbet. Prvi reševalec naj mu razklene veki poškodovanega očesa, drugi pa z vodo iz kozarca hitro in dobro večkrat izpere oko.

Če kozarca ni pri roki, namočimo v čisto vodo kos vate ali gaze ali čisti robec in ga ožemamo v oko. Če je drobec apna v očesu, je treba pregledati notranjo stran obeh vek in ga odstraniti – izbrisati iz očesa tako kot pri tujku v očesu. Oko nato obvezemo in poškodovanca prepeljemo na pregled k okulistu.

LITERATURA

1. Bilban M. Medicina dela. Ljubljana: Zavod za varstvo pri delu, 1999
2. Šarić M, Žuškin E. Medicina rada i okoliša. Zagreb : Medicinska naklada, 2002: 428–54.
3. Vidaković A. Medicina rada II. Beograd: KCS Institut za medicinu rada i radiološku zaštitu, Udruženje za medicinu rada Jugoslavije, 1997.
4. Bilban M. Prva pomoč v delovnem okolju. Ljubljana: Zavod za varstvo pri delu , 2009.
5. Bilban M, Teržan M, Pušnik S. Medicina dela za zdravnike družinske medicine: priročnik. Ljubljana: ZZD - Slovensko zdravniško društvo, Združenje za medicino dela, prometa in športa, 2002.
6. Bilban M. Medicina dela za študente tehniške varnosti. Ljubljana: Zavod za varstvo pri delu, 2005.
7. Kansky A. Kožne in spolne bolezni. Ljubljana: Združenje slovenskih dermatovenerologov, 2002
8. Šuškovič S, Košnik M, Šorli J. Astma. Golnik: Klinika za pljučne bolezni in alergijo, 2000.
9. LaDou J. Occupational & environmental medicine. 2nd ed. Stamford: McGraw- Hill, 1997.

UVOD

Po pravilniku o izvajanju poskusov na živalih (Ur. l. RS 88/2006) se med splošnimi pogoji zahteva program rednega vzdrževanja objekta, v nastanitvenih prostorih za laboratorijske živali pa mora biti zagotovljeno:

- redno in učinkovito mehanično čiščenje prostorov in opreme;
- program čiščenja in navodila za čiščenje prostorov in opreme;
- vodenje evidence o opravljenem čiščenju prostorov in opreme;
- gladka, pralna in neprepustna površina tal, sten in stropov;
- pokriti in zaščiteni odtoki;
- okna in vrata, ki ne dopuščajo vstopa drugih živali;
- dodatna zaščita opreme in instalacij v prostoru za izpust.

V pomožnih prostorih mora biti zagotovljeno:

- suhi ter pred škodljivci in insekti zavarovani skladiščni prostori;
- suhi ter pred škodljivci in insekti zavarovani skladiščni prostori za steljo;
- pomivalnica, ki je dovolj velika za namestitev naprav za razkuževanje, čiščenje in prezračevanje;
- pretok čiste in umazane opreme;
- pralni tla in stene;
- varno skladiščenje in neškodljivo odstranjevanje trupel in živalskih odpadkov;

pri čemer morajo biti:

- kletke in ograde iz materialov, primernih za čiščenje in razkuževanje;
- krma, krmilniki, korita in oprema za krmljenje redno očiščeni in po potrebi sterilizirani;
- voda in oprema za napajanje iz materiala, ki se ga da čistiti in razkuževati;
- steklenice in dodatna oprema redno čiščene, razkužene in po potrebi sterilizirane;
- stelja suha, vpojna, brez prahu, kužnih in drugih kontaminantov.

Določeni morajo biti navodila in vodenje evidenc za čiščenje, menjavo stelje, razkuževanje, sterilizacijo kletk, steklenic, pribora, opreme in drugih pripomočkov. Talne površine zunanjih ograd, staj in izpustov morajo biti redno čiščene in vzdrževane.

IZVAJANJE SANITACIJE

Izvajanje sanitacije, ki vključuje čiščenje in DDD (dezinfekcija = razkuževanje, dezinsekcija = zatiranje insektov, deratizacija = zatiranje glodavcev), izvajano v skladu s Pravilnikom o pogojih za izvajanje veterinarske dejavnosti dezinfekcije, dezinsekcije in deratizacije (Ur. l. RS, št. 72/2004), je skupaj z menjavo nastila bistvenega pomena pri vzdrževanju zdravstveno-higienskih pogojev prostorov za laboratorijske živali. Čiščenje je osnovni in temeljni ukrep za odstranitev nečistoč in s tem skorajda 90 odstotkov mikroorganizmov. Pogostnost in intenziteta čiščenja sta odvisna od potreb po vzdrževanju čistega in neoporečnega okolja.

Metode so različne in odvisne od številnih dejavnikov:

- fizikalnih lastnosti in velikosti prostorov in opreme;
- tipa, števila, velikosti, starosti in reprodukcijskega statusa živali;
- uporabe in tipa nastila;
- temperature in relativne vlažnosti;
- narave materialov, ki pogojujejo izvedbo sanitacije;
- normalnih fizioloških in vedenjskih značilnosti živali in
- stopnje zamazanosti površin prostora za rejo poskusnih živali.

Nekateri sistemi vhlevitve poskusnih živali zahtevajo posebne pogoje ravnanja z nastilom, aseptično rokovanje in zamenjavo stelje. Preparati, ki maskirajo vonj živali v prostorih za rejo, niso dovoljeni. V nobenem primeru ne morejo nadomestiti sanitacije ali prezračevanja, poleg tega lahko živalim, ki so izpostavljene tem hlapnim substancam, spremenijo osnovne fiziološke in presnovne procese.

ZAMENJAVA STELJE

Menjava stelje sodi med prve higienske ukrepe in pomeni menjavo izrabljenega, umazanega nastila s svežim, da bi živali ostale čiste in suhe. Pogostnost menjave stelje je odvisna od strokovne presoje skrbnikov in izvajalcev poskusov ter:

- števila in kategorije (velikosti, teže) živali,
- velikosti kletke,
- količine izločenega fecesa in urina na žival,
- izrabljenosti nastila (vlažnost, zamazanost),
- vrste poskusa (operativni posegi na živali).

Pogostnost menjave stelje je torej odvisna od naštetih pogojev, kar pomeni dnevno do tedensko menjavo nastila. V nekaterih primerih je prepogosta menjava nastila slaba rešitev, še posebej v obdobju kotitve, ko feromoni igrajo pomembno vlogo za uspešno reprodukcijo ali kadar zvrst poskusov ne dovoljuje zamenjave stelje (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996).

ČIŠČENJE IN DEZINFEKCIJA KLETK ZA ŽIVALI

Redno spiranje z vodo in občasna uporaba detergentov zadoščata za vzdrževanje zadostno čistih površin. Iztrebke živali je potrebno spirati vsaj enkrat dnevno. Med čiščenjem je živali potrebno zaščititi. Čas čiščenja je odvisen tudi od obnašanja in navad živali. Na primer živali največkrat defecirajo po hranjenju, kar je dobro upoštevati pri izbiri časa čiščenja. Pogostnost čiščenja kletk, jasl, krmilnikov in napajalnikov je odvisna od:

- potreb po menjavi nastila,
- vrste dna (rešetkasto, žičnato dno, polno dno),
- bolj ali manj rednega spiranja viseče opreme v kletkah.

V glavnem je potrebno čiščenje prostorov in opreme opravljati vsaj na dva tedna. Kletke s polnimi tlemi, napajalnice in steklenice je potrebno čistiti vsaj enkrat tedensko. Nekatere tipe kletk se čisti redkeje, in sicer ob nizki gostoti živali, pri živalih, ki živijo v gnotobiotičnih pogojih (aseptičnih), kjer se nastil redno zamenjuje, individualno zračenih kletkah in tistih, ki se uporabljajo v posebnih pogojih. V nekaterih primerih je potrebno čistiti tudi večkrat, kadar so živali v kletki zelo gosto poseljene (mikroizolacija).

Kunci in nekateri glodavci, kot so budre in hrčki, izločajo urin, zelo bogat z minerali in proteini. Minerali in organske snovi se zelo rade sprimejo s površinami kletk, zato jih je pred pranjem površine potrebno oškropiti s kislimi čistili, ki jih razgrajujejo.

Vse površine se po čiščenju lahko tudi razkužijo s kemikalijami, vročo vodo ali njihovimi kombinacijami. Izbira čistil in razkužil ter čas njihovega učinkovanja na površinah morata biti zadostna, da uničita večino vegetativnih oblik mikroorganizmov. Če se za sanitacijo uporablja le vroča voda, je potrebno dovolj časa, da se na površinah zaradi visoke temperature doseže fizikalni baktericidni učinek. Na ta način se doseže tako imenovani kumulativno temperaturni faktor, ki je identičen, če površine izpostavimo zelo nizkim temperaturam, toda v bistveno daljšem času kot v primeru učinkovanja visokih temperatur. Učinkovita dezinfekcija se pri spiranju in namakanju z vročo vodo doseže pri 61–82 °C (ali več). Načeloma naj bi čistila in nekatera razkužila bolje delovala pri višjih temperaturah raztopin z vodo, vendar je to potrebno sproti preveriti glede na navodila proizvajalca. Čistila in razkužila je potrebno s površin po delovanju sprati z vodo. Čiščenje in razkuževanje se večinoma opravlja ročno, pri čemer je potrebno delati natančno in se prepričati, da se čistila in razkužila nanašajo na površine, ki predhodno niso obdelane z drugimi kemikalijami, delavec pa mora biti ustrezno zaščiten. Razkuževanje se opravi skladno z izborom metode in razkužila glede na vrsto testiranega kužnega agensa oziroma na način, ki zagotovi baktericidni, virucidni in sporocidni učinek.

Steklenice, napajalniki, zamaški, krmilniki in ostali manjši deli opreme se operejo z detergenti, vročo vodo in – kadar je potrebno – tudi z razkužili. Še posebej moramo biti pozorni na avtomatske sisteme napajanja, saj so za čiščenje razmeroma nedostopni. Občasno se spirajo z velikimi količinami vode oziroma raztopinami čistil (razkužil), pri čemer ne smemo pozabiti na končno spiranje s čisto vodo. Permanentno razkuževanje vode in napajalnikov se lahko izvaja tudi z uporabo ultravijoličnih svetil in ustreznih filtrov.

Če je po običajni sanitaciji, ki sicer uniči od 95–99 odstotkov mikroorganizmov, zaradi prizadetega imunskega sistema živali ali še vedno obstoječe nevarnosti prisotnosti patogenih (sporogenih) mikroorganizmov kletke in opremo potrebno sterilizirati (100-odstotno uničenje mikroorganizmov), le-te steriliziramo v sterilizatorjih (O. I. E., 1995).

ČIŠČENJE IN DEZINFEKCIJA OSTALIH PROSTOROV IN OPREME

Ostale prostore (hlevček, skladišče, hodniki, prostori za izvajanje poskusov) se prav tako redno čisti in po potrebi razkužuje. Oprema za sanitacijo mora biti primerno skladiščena v posebnih in primernih prostorih, katerih lokacija omogoča dostop v vse prostore, ne da bi opremo prenašali med prostori. Prav tako je potrebno opremo (iz nerjavečega materiala) ustrezno vzdrževati, jo čistiti in razkuževati. Razkužuje se na način, ki zagotovi baktericidni, virucidni in sporocidni učinek. V primeru dela s kužnim materialom je potrebno zagotoviti tudi filtracijo zraka oziroma podtlak.

PREVERJANJE UČINKOVITOSTI SANITACIJE

Preverjanje učinkovitosti sanitacije se izvaja po vsakem čiščenju in razkuževanju. Kriteriji za učinkovitost so:

- dosledno upoštevanje programa čiščenja in razkuževanja,
- preverjanje temperature vode v toplovodnem sistemu,
- mikrobiološki monitoring (jemanje brisov).

Prisotnost vonjav zaradi živali – še posebej amoniaka – ni kriterij za ugotavljanje uspešnosti sanitacije!

UNIČEVANJE INSEKTOV IN GLODAVCEV

Programi za preventivo in zatiranje insektov ter glodavcev so nujni za vzdrževanje aseptičnega okolja. Dezinfekcija in deratizacija sta neizogibna spremljevalca vsake reje živali in tudi poskusnih živali. Odstranjevanje nečistoč in nepotrebne navlake v prostorih ter zapiranje so nujni ukrepi pri

preprečevanju vdora in nujenja zatočišča mrčesu in glodavcem. Pri nastavljanju vab in izbiri preparatov za uničevanje škodljivcev, ki so visoko toksični biocidi, je potrebno biti zelo previden, da ne bi morda prišli v stik s poskusnimi živalmi. Obenem obstaja tudi tveganje toksičnih učinkov na živali v poskusih! Vrsto preparata in način dela v dezinsekciji in deratizaciji je potrebno uskladiti med izvajalci poskusov, skrbniki in zakonodajo.

ODSTRANJEVANJE ODPADKOV

Vse biološke, nevarne in običajne odpadke je potrebno redno odstranjevati. Možnosti odstranjevanja so različne. Večino odpadkov odpeljejo na predelavo pooblaščne organizacije. Odpadki se morajo hraniti izven prostorov za rejo živali in poskuse v zaprtih nepropustnih zabojnikih. Ti morajo biti redno čiščeni in razkuženi. Zabojniki se navadno namestijo v prirejenem (po možnosti ohlajenem) prostoru, zaščitenem pred vdorom insektov in glodavcev. Nevarni in kužni odpadki se sterilizirajo, preden se jih odloži v zabojnike! Radioaktivni odpadki in živalski stranski proizvodi kategorije 1 se odstranjujejo glede na zakonodajo Republike Slovenije. Toksični, kancerogeni, vnetljivi, korozivni, reaktivni odpadki se hranijo v posebnih kontejnerjih in jih odstranjujejo pooblaščne organizacije.

LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16 (88): 2477. (z dne 18. 8. 2006)
2. Pravilnik o pogojih za izvajanje veterinarske dejavnosti dezinfekcije, dezinsekcije in deratizacije. Ur List RS 2004; 14 (72): 8743. (z dne 2. 7. 2004)
3. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources Commision on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academic Press, 1996.
4. Disinfectants: actions and applications. Rev Sci Tech 1995; 14 (1).
5. Disinfectants: actions and applications. Rev Sci Tech 1995; 14 (2).

UVOD

Raziskovalnega procesa se moramo lotiti sistematično, da ne bi prezrli nobenega pomembnega koraka, kar bi nas lahko napeljalo do napačnega zaključka. Kumar (2005) priporoča splošni raziskovalni model, ki je sestavljen iz dveh delov, to sta načrtovanje in izvedba raziskave, ki ju je nadalje razčlenil na osem faz. V njih opredelimo cilj raziskave in izberemo najboljšo raziskovalno pot, s katero bomo dosegli zastavljeni cilj. Raziskovalni model je sestavljen iz načrtovanja raziskave, ki vključuje:

1. opredelitev raziskovalnega problema (proučevanega pojava)
2. izdelavo koncepta raziskave
3. izdelavo instrumenta za zbiranje podatkov
4. izbiro vzorca
5. pisanje raziskovalnega predloga

ter

izvedbe raziskave, ki vključuje:

6. zbiranje podatkov
 7. obdelavo podatkov
 8. pisanje raziskovalnega poročila
1. Opredelitev raziskovalnega problema je ena najpomembnejših faz raziskovalnega procesa, saj je od nje odvisna vsebina ostalih faz raziskovalnega procesa. V njej opredelimo cilj raziskave, to je *kaj* bomo proučevali. Cilj raziskave mora biti opredeljen natančno in jasno.
 2. Z izdelavo koncepta raziskave pojasnimo, *kako* bomo poiskali odgovore na zastavljena raziskovalna vprašanja. V tej fazi poleg samega koncepta opredelimo še, kaj in kako bomo merili, strategijo vzorčenja, okvir analize in njen časovni okvir.
 3. Vsako sredstvo, s katerim zbiramo podatke za raziskavo, se imenuje 'raziskovalno orodje' ali 'raziskovalni instrument'. Najpogostejše uporabljeni raziskovalni instrumenti za zbiranje podatkov so načrt intervjuja, vprašalnik, navodila za izvedbo intervjuja. Če za raziskavo načrtujemo uporabo primarnih podatkov, izdelamo instrument za zbiranje podatkov sami ali uporabimo takega, ki je bil že uporabljen v drugih raziskavah. Če pa načrtujemo uporabo sekundarnih podatkov (že zbranih podatkov v druge namene), izdelamo dokument, v katerega se vpisujejo potrebni sekundarni podatki.
 4. Natančnost in zanesljivost naših ugotovitev je v veliki meri odvisna tudi od načina, kako smo izbrali vzorec. Najpomembnejši cilj pri izbiri vzorčne strategije je, ob upoštevanju stroškov raziskave, minimiziranje razlik med vrednostmi, ki jih izračunamo iz vzorca, in tistimi, ki veljajo za statistično množico. Osnovno načelo vzorčenja je z relativno majhnim številom izbranih statističnih enot dobiti z visoko verjetnostjo dokaj realno sliko o proučevani statistični množici. Teorija vzorčenja temelji na dveh pomembnih načelih, to je na načelu nepristranosti in načelu maksimalne natančnosti. Pri izbiri vzorčenja izbiramo med slučajnim, ne-slučajnim, in mešanim vzorčenjem. V okviru prvih dveh obstaja več strategij vzorčenja. Poznavanje vzorčnih strategij omogoča uporabniku izbiro najboljše strategije glede na postavljeni cilj raziskave in raziskovalna vprašanja.
 5. Rezultate prvih štirih faz, v katerih so bila opravljena potrebna pripravljalna dela za uspešno izvedbo raziskave, strnemo v raziskovalnem predlogu. V njem je natančno opisan raziskovalni problem in podrobno predstavljen načrt raziskave.
 6. Potem ko smo opravili prve štiri faze in njihove rezultate strnili v raziskovalnem predlogu, pričnemo s samo raziskavo. Ta se prične z zbiranjem podatkov, ki jih bomo uporabili pri iskanju odgovorov na zastavljena raziskovalna vprašanja. Zbiranje podatkov je odvisno od vrste potrebnih

podatkov (primarni, sekundarni) in od izbranega raziskovalnega instrumenta. Ne glede na izbrano metodo zbiranje podatkov poraja nekaj etičnih problemov.

7. V fazi obdelave podatkov se zbrani podatki obdelajo v informacije, s katerimi bomo poskušali dati zanesljive odgovore na zastavljena raziskovalna vprašanja. Metode, ki jih bomo uporabili pri obdelavi zbranih podatkov, so odvisne od:

- vrste zbranih podatkov (opisni, številski)
- načina predstavitve dobljenih rezultatov zainteresiranim javnostim

V teoriji se raziskave delijo v kvantitativne in kvalitativne. Večino dejansko opravljenih raziskav je težko razvrstiti le v eno skupino, saj se pri večini uporabljajo tako kvalitativne kot kvantitativne metode.

8. Raziskava se konča s pisanjem raziskovalnega poročila. V poročilu seznanimo zainteresirano javnost, kaj smo proučevali, kaj smo odkrili in kateri zaključki sledijo našim ugotovitvam.

Primer 1 – opredelitev raziskovalnega problema in opis korakov

Preveriti želimo, ali dejavnika vstavljeni gen in starost miške vplivata na razvoj tumorja na vranici. V ta namen bomo opravili raziskavo, v kateri bomo 18 mesecev spremljali rast tumorja na vranici na slučajnem vzorcu 161 različno starih mišk, in sicer pri starosti tri, šest, dvanajstin osemnajstmesecev. Po fenotipu pa jih bomo razvrstili v dve skupini: transgene miške (plus) in miške divjega tipa (minus).

OPREDELITEV OSNOVNIH POJMOV

Statistična enota je lahko vsak pojav, ki v času in prostoru množično nastopa in je predmet statističnega proučevanja. Statistična enota v primeru 1 je miška.

Statistična množica (populacija) je množica vseh statističnih enot, ki imajo vnaprej določene lastnosti.

1. Statistična spremenljivka

Je merljiva lastnost ali atribut statistične enote. Običajno označuje lastnost, ki se razlikuje med enotami in skozi čas. Spremenljivke so lahko opisne ali številske.

Opisne spremenljivke merimo na dva načina:

- **Nominalna lestvica** omogoča razvrščanje enot po določeni skupni značilnosti. Statistične enote razvrščamo v skupine tako, da imajo enote, razvrščene v isto skupino, isto značilnost. Spol, fenotip merimo na nominalni lestvici. Enote razvrstimo po spolu v dve skupini (moški, ženske). Po fenotipu pa miške razvrstimo v dve skupini: transgene miške (pozitivne) in miške divjega tipa (negativne).
- **Ordinalna lestvica** ima vse lastnosti nominalne lestvice in dodatno lastnost, da je skupine mogoče rangirati. Po starosti lahko miške razvrstimo v več skupin. Na primer: trimesečne miške, šestmesečne miške in enoletne miške. Starost je običajno številska zvezna spremenljivka, vendar je v primeru 1 obravnavana kot opisna, saj smo miške razvrstili po starosti v več skupin. Ker je te skupine mogoče smiselno velikostno primerjati med seboj oziroma je med njimi mogoče opredeliti odnose »večje« ali »manjše«, torej je opisne vrednosti mogoče rangirati, je spremenljivka starost tukaj obravnavana kot opisna spremenljivka.

Številske spremenljivke merimo z metričnimi lestvicami:

- **Intervalna lestvica** ima vse lastnosti ordinalne lestvice in še lastnost, da uporablja enoto mere. Med začetno in končno točko je lestvica razčlenjena na enako velike intervale. Začetna in končna točka ter število intervalov so pri intervalni lestvici poljubno določeni. Celzijeva in Fahrenheitova lestvica sta primera intervalne lestvice. Ker sta začetna in končna točka poljubno določeni, ta lestvica ni absolutna.
- **Razmernostna lestvica** ima vse lastnosti predhodno opisanih lestvic in še lastnost, da se njena začetna točka nič ne spreminja. Zato je to absolutna lestvica, razlika se vedno meri od točke nič. Spremenljivke, kot so na primer masa (40 g), starost (1,2 leta), strošek hrane (50 €), se merijo z razmernostno lestvico. Za vrednosti teh spremenljivk velja še, da je na primer miška z maso 40 g dvakrat težja od miške z maso 20 g.

2. Parameter

Je lastnost statistične množice. Njegova vrednost se računa iz vrednosti spremenljivke, ki pripadajo enotam statistične množice. Aritmetična sredina in varianca sta osnovna parametra statistične množice. Aritmetična sredina statistične množice je definirana z:

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i,$$

kjer je x_i vrednost spremenljivke pri statistični enoti i in N število enot v statistični množici. Najpomembnejši meri variabilnosti sta varianca in standardni odklon. Varianca (σ^2) je opredeljena kot povprečni kvadrirani odklon vrednosti od aritmetične sredine:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2.$$

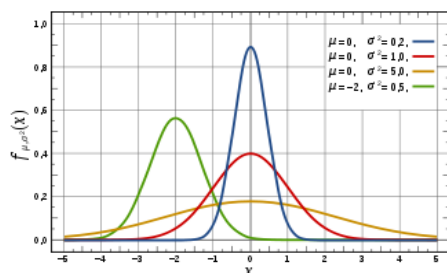
Standardni odklon σ je opredeljen kot kvadratni koren iz variance. Z njim merimo, kako so vrednosti spremenljivke razpršene okoli aritmetične sredine statistične množice ali vzorca. Višja kot je njegova vrednost, bolj so enote razpršene okoli povprečne vrednosti.

3. Normalna porazdelitev

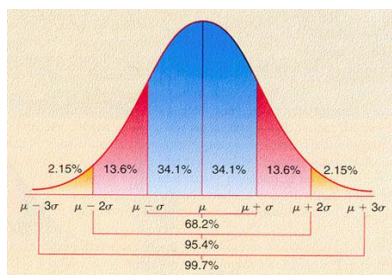
Pomembno vlogo v statistiki ima normalna ali Gaussova porazdelitev. Je najpomembnejša teoretična porazdelitev. Je simetrična okoli μ , unimodalna (en vrh), ploščina pod krivuljo je enaka 1. Njeno lego določa aritmetična sredina, obliko pa standardni odklon (slika 1), kar krajše zapišemo $X: N(\mu, \sigma^2)$. Porazdelitev $N(0, 1)$ imenujemo *standardizirana normalna porazdelitev*. Normalno porazdeljeno spremenljivko $X: N(\mu, \sigma^2)$ pretvorimo v standardizirano normalno porazdeljeno spremenljivko $Z: N(0, 1)$ z upoštevanjem transformacijske enačbe:

$$Z_i = \frac{x_i - \mu}{\sigma}.$$

Slika 1. Normalna porazdelitev.



Slika 2. Normalna porazdelitev in odstotek statističnih enot z vrednostjo spremenljivke v določenih intervalih.



VZORČENJE

1 Strategije vzorčenja

Vzorčenje je proces izbire manjšega števila enot iz statistične množice. Vzorec je torej podmnožica statistične množice. Velikost vzorca označujemo z n . Vzorčni okvir je seznam enot v statistični množici. Značilnosti statistične množice, izračunane iz vzorca, imenujemo statistika. Statistika je ocena parametra. Natančnost statistike je odvisna od velikosti vzorca in variabilnosti spremenljivke. Vzorčna napaka je razlika med vrednostjo parametra in statistiko.

Glede na način izbire enot v vzorec ločimo:

- slučajni vzorec (probability sample)
- neslučajni vzorec

Načini slučajnega vzorčenja

- Enostavno slučajno vzorčenje – vsaka statistična enota ima enako verjetnost, da bo izbrana v vzorec. Vzorčenje se opravi s pomočjo slučajnih števil (preglednica slučajnih števil, žrebanje, generator slučajnih števil).
- Sistematično slučajno vzorčenje – iz vzorčnega okvirja izberemo vsako K -to enoto. Slučajnost pri izbiri enot zagotovimo s slučajnim izborom prve enote, ki je izbrana med nizom števil od 1 do K . K je določen z:

$$K = \frac{N}{n} \text{ in celo število,}$$

kjer je N število enot v statistični množici in n število enot v vzorcu.

- Stratificirano slučajno vzorčenje – uporabimo, kadar je statistična množica heterogena, ki jo razdelimo v homogene podmnožice. Imenujemo jih stratum. Za vsak stratum sestavimo vzorčni okvir. Na slučajni način izberemo enote iz vsakega stratuma. Izbiranje enot v vzorec je lahko:
 - Neproporcionalno vzorčenje je smiselno predvsem takrat, kadar nas zanima primerjava značilnosti posameznih stratumov – iz vsakega stratuma vzamemo enako število enot. Število enot, ki jih izberemo iz vsakega stratuma, je določeno z:
 - velikost vzorca/število stratumov.
 - Proporcionalno vzorčenje nas dejansko privede do enake strukture vzorca, kot bi jo dobili, če bi uporabili enostavno slučajno vzorčenje. Iz vsakega stratuma vzamemo toliko enot, da je struktura vzorca enaka strukturi statistične množice glede na stratum. Število enot, ki jih izberemo iz vsakega stratuma, je:
 - velikost vzorca $\times$ delež stratuma.

Načini neslučajnega vzorčenja

- kvotno vzorčenje – uporabimo, ko nimamo vzorčnega okvirja, znane pa so kvote po stratumih.

Inferenčna statistika obsega metode, ki jih uporabljamo zato, da iz značilnosti slučajnega vzorca sklepamo na značilnosti statistične množice.

2 Točkovna ocena in interval zaupanja za povprečno vrednost

Iz vzorčnih podatkov lahko le ocenimo, koliko je vrednost aritmetične sredine spremenljivke v statistični množici. Možni sta dve oceni tega parametra: točkovna in intervalna ocena. Točkovna ocena aritmetične sredine spremenljivke X je vzorčna vrednost aritmetične sredine in je enaka

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i.$$

Z večanjem velikosti vzorca (n) se vzorčna aritmetična sredina vse bolj približuje aritmetični sredini statistične množice, iz katere je izbran vzorec. Nepristranska ocena variance (vzorčna varianca) spremenljivke X je enaka:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2.$$

Iz značilnosti vzorca sklepamo na značilnosti statistične množice. Iz množice vseh vzorcev, katerih število (K) je določeno z:

$$K_n^N = \frac{N!}{(N-n)! n!},$$

izberemo le en vzorec velikosti n z vzorčno aritmetično sredino $\bar{X}$ in vzorčno varianco s^2 . Če bi iz množice vzorcev vzeli več vzorcev, bi praviloma za vsak vzorec dobili drugačno vzorčno aritmetično sredino in vzorčno varianco. Vzorce aritmetične sredine vseh vzorcev velikosti n se porazdeljujejo po normalni porazdelitvi, če je spremenljivka X normalno porazdeljena ali če ima vzorec več kot 30 enot ($n > 30$).

Variabilnost vzorčnih aritmetičnih sredin opisuje standardna napaka ocene aritmetične sredine ($SE_{\bar{x}}$), ki je enaka:

$$SE_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \approx \frac{s}{\sqrt{n}},$$

kjer je σ standardni odklon spremenljivke X , izračunan iz podatkov statistične množice, in s vzorčni standardni odklon. Ker se velikokrat zgodi, da σ ne poznamo, ga v izračunu nadomestimo z vzorčnim standardnim odklonom s . Pri velikih vzorcih ali ko poznamo σ , se povprečne vrednosti porazdeljujejo

po normalni porazdelitvi $\bar{X} : N\left(\mu, \frac{\sigma^2}{n}\right)$ ali $\bar{X} : N\left(\mu, \frac{s^2}{n}\right)$. Pri majhnih vzorcih (do 30 enot, $n \leq 30$) se vzorčne aritmetične sredine porazdeljujejo po Studentovi porazdelitvi (t -porazdelitvi) z $(n-1)$ stopinjami prostosti.

Intervalna ocena za povprečno vrednost se imenuje tudi interval zaupanja za povprečno vrednost. Za vsak slučajni vzorec lahko izračunamo interval zaupanja, ki pove, da je verjetnost, da povprečna vrednost spremenljivke X iz statistične množice (μ) leži v tem intervalu, enaka $1-\alpha$. α označuje stopnjo tveganja ali stopnjo značilnosti preizkusa. Za velike vzorce ali male vzorce z znano varianco spremenljivke X iz statistične množice je intervalna ocena aritmetične sredine opredeljena z:

$$P\left(\bar{X} - z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot SE_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot SE_{\bar{X}}\right) = 1 - \alpha,$$

kjer je z standardizirana vrednost spremenljivke X , določena z:

$$z = \frac{\bar{x} - \mu}{SE_{\bar{X}}}.$$

Aritmetične sredine za male vzorce ($n \leq 30$) so porazdeljene po t -porazdelitvi, zato je intervalna ocena aritmetične sredine opredeljena z:

$$P\left(\bar{X} - t_{n-1; \alpha/2} \cdot SE_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + t_{n-1; \alpha/2} \cdot SE_{\bar{X}}\right) = 1 - \alpha.$$

Za stopnjo tveganja α običajno vzamemo 0,05, 0,01 ali 0,001.

Obstaja več računalniških programov za statistično obdelavo podatkov, kot so SPSS, SAS, STATA, STATISTI, UNISTAT, Minitab, Excel, MedCalc in drugi. Statistična analiza podatkov v primerih, ki sledijo, bo opravljena s programom SPSS 19.

Primer 1. Točkovna in intervalna ocena spremenljivke 'Vranica_teza'.

Rast tumorja vranice smo spremljali z merjenjem teže vranice, ki smo ji priredili spremenljivko 'Vranica_teza'. Zanima nas, koliko je ocena povprečne teže vranice mišk in koliko je intervalna ocena povprečne vrednosti pri stopnji tveganja 0,05. S programom SPSS 19 dobimo izpis, prikazan v preglednici 1.

Preglednica 1. Deskriptivna statistika za spremenljivko 'Vranica_teza'.

(Processing...)

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Vranica_teza	161	100,0%	0	,0%	161	100,0%

Descriptives					Statistic	Std. Error
Vranica_teza	Mean				,387329	,0459363
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			,296610	
		Upper Bound			,478049	
	5% Trimmed Mean				,293879	
	Median				,170000	
	Variance				,340	
	Std. Deviation				,5828659	
	Minimum				,0480	
	Maximum				3,3200	
	Range				3,2720	
	Interquartile Range				,1315	
	Skewness				2,803	,191
	Kurtosis				7,711	,380

Extreme Values					Case Number	Value
Vranica_teza	Highest	1			138	3,3200
		2			121	2,7400
		3			134	2,5800
		4			124	2,4000
		5			122	2,3000
	Lowest	1			52	,0480
		2			22	,0800
		3			60	,0900
		4			59	,0900
		5			81	,0930

V vzorcu imamo 161 mišk (vrednost N v preglednici Caseprocesingsummary). Točkovna ocena aritmetične sredine (Mean) znaša 0,387329 g. V preglednici 'ExtremeValues' je podanih 5 največjih in 5 najmanjših vrednosti proučevane spremenljivke z namenom, da bi lažje odkrili netipične vrednosti spremenljivke. Med rezultati je tudi 'očiščena povprečna vrednost' (Trimmed Mean). '5 %TrimmedMean' pomeni, da pri računanju te ocene povprečne vrednosti ni bilo upoštevanih 5 % najmanjših in 5 % največjih vrednosti spremenljivke. Variabilnost vzorčnih povprečnih vrednosti $SE_{\bar{x}}$ (Std. Error) je enaka 0,0459363 g. Vrednost mediane je 0,17 g in pove, da ima polovica mišk težo manjšo ali enako od 0,17 g in polovica mišk težo večjo od mediane.

Variabilnost proučevane spremenljivke 'Teža vranice' je merjena z varianco (Variance), ki znaša 0,340 g², in standardnim odklonom (Std. Deviation), ki je 0,5828659 g, ter z variacijskim razmikom (Range), ki je enak razliki med najmanjšo težo (0,0480 g) in največjo težo (3,32 g) ter znaša 3,272 g. Spodnja meja (LowerBound) 95 % intervala zaupanja (95 % Confidence Interval forMean) je 0,296610 g, zgornja meja (UpperBound) pa je 0,478049 g. Interval zaupanja lahko zapišemo tudi tako:

$$P(0,296610 < \mu < 0,478049) = 0,95$$

in izraža, da je verjetnost za to, da bo povprečna teža vranice v statistični množici večja od 0,296610 g in manjša od 0,478049 g, enaka 0,95.

3 Velikost vzorca

Natančnost ocene aritmetične sredine je odvisna od velikosti vzorca in variabilnosti spremenljivke v statistični množici. Z izborom primerne velikosti vzorca lahko zagotovimo želeno natančnost ocene aritmetične sredine pri določeni stopnji tveganja (ob znani ali ocenjeni vrednosti variabilnosti spremenljivke, σ). Označimo odstopanje vzorčne aritmetične sredine od aritmetične sredine statistične množice z $E_{\bar{x}}$, ki je enako:

$$E_{\bar{x}} = z_{\alpha/2} \cdot SE_{\bar{x}} = z_{\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Iz zgornje enačbe izračunamo najmanjše potrebno število enot v vzorcu (n), ki je enako:

$$n = \left(\frac{z_{\alpha/2} \cdot \sigma}{E_{\bar{x}}} \right)^2.$$

Če želimo dobiti želeno natančnost ocene aritmetične sredine s stopnjo tveganja 0,05, tedaj je $z_{0,025} = 1,96$. Najmanjše potrebno število enot v vzorcu (n) se povečuje z zmanjševanjem stopnje tveganja ali z zmanjševanje dovoljenega odstopanja $E_{\bar{x}}$.

Primer 2. Izračun velikosti vzorca.

Izračunajmo, kolikšna bi morala biti velikost vzorca, da bi z verjetnostjo 0,95 zagotovili, da največje dovoljeno odstopanje vzorčne povprečne teže vranice ne bo večje od 0,039 g, ter kolikšno je največje odstopanje pri vzorcu s 161 enotami. Standardni odklon teže vranice v statistični množici je 0,58 g.

Velikost vzorca n bomo izračunali s pomočjo obrazca

$$n = \left(\frac{z_{\alpha/2} \cdot \sigma}{E_{\bar{x}}} \right)^2.$$

V primeru 3 je $E_{\bar{x}} = 0,039 \text{ g}$, $\sigma = 0,58 \text{ g}$ in $z_{0,025} = 1,96$. Če te podatke vstavimo v obrazec za izračun n , dobimo, da je n enak 850 enot oz. mišk.

Če bi vzeli vzorec s 161 miškami, bi se odstopanje izračunane povprečne teže vranice iz vzorca razlikovalo od povprečne teže za statistično množico za

$$E_{\bar{x}} = z_{\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 1,96 \cdot \frac{0,58}{\sqrt{161}} = 0,08959 \text{ g}.$$

PREIZKUŠANJE DOMNEV

1 Opredelitev domneve

Statistična domneva (hipoteza) pomeni nedokazano, zgolj verjetno trditev o parametru, teoretični porazdelitvi ali odvisnosti med spremenljivkami. Postopek preverjanja njene pravilnosti imenujemo statistično testiranje. Preverjano domnevo imenujemo ničelna domneva in jo označimo s H_0 , njej nasprotujočo (alternativno) domnevo pa raziskovalna domneva (H_1). Ničelna domneva vedno trdi, da je vrednost parametra (na primer povprečje spremenljivke v statistični množici) enaka neki vrednosti ali da sta povprečni vrednosti dveh statističnih množic enaki. Nasprotna ali raziskovalna domneva pa trdi, da povprečna vrednost parametra ni enaka neki vrednosti (dvostranska domneva) ali da je povprečna vrednost parametra večja (manjša) od neke vrednosti (enostranska domneva). Pri preverjanju domnev se najpogosteje opiramo na vzorčne podatke, zato ni mogoče z gotovostjo ugotoviti, ali trditev velja ali ne.

Preverjamo veljavnost ničelne domneve, in če je ne potrdimo, to posredno pomeni, da sprejmemo nasprotno, to je domnevo H_1 . Pri preverjanju domneve H_0 so, glede na dejansko veljavnost te domneve, možni naslednji izidi:

	Naš zaključek	
	H_0 nismo zavrnili	H_0 smo zavrnili
H_0 je pravilna	Zaključek je pravilen	Zaključek je napačen Naredili smo napako 1. vrste - α
H_0 je nepravilna	Zaključek je napačen Naredili smo napako 2. vrste - β	Zaključek je pravilen

Z α smo označili verjetnost, da smo naredili napako 1. vrste, z β pa verjetnost, da smo naredili napako 2. vrste. Z zmanjševanjem α se povečuje β . Vrednosti α in β lahko hkrati zmanjšamo le, če povečamo velikost vzorca. V postopku preverjanja ničelne domneve moramo določiti zgornjo vrednost za α (stopnjo značilnosti testa), pri kateri domneve H_0 ne zavrnemo. Običajno vzamemo za $\alpha = 0,05$ ali $0,01$.

Postopek preizkušanja domnev

1. Postavimo ničelno in nasprotno domnevo.
2. Izberemo ustrezeni preizkus in izračunamo vrednost testne statistike.
3. Zavrnemo ničelno domnevo, če ugotovimo, da je proučevana razlika statistično značilna.
Razlika je statistično značilna, če je vzorčna ocena v kritičnem območju. Tedaj je vrednost testne statistike

1. pri enostranskem preizkusu

- enaka ali večja od ustrezne tabelirane vrednosti pri stopnji značilnosti α , če je kritično območje na desni strani porazdelitve vzorčnih ocen, ali
- enaka ali manjša od ustrezne tabelirane vrednosti pri stopnji značilnosti α , če je kritično območje na levi strani porazdelitve vzorčnih ocen

2. pri dvostranskem preizkusu

- enaka ali večja od ustrezne tabelirane vrednosti pri stopnji značilnosti $\alpha/2$, če je kritično območje na desni strani porazdelitve vzorčnih ocen, ali
- enaka ali manjša od ustrezne tabelirane vrednosti pri stopnji značilnosti α , če je kritično območje na levi strani porazdelitve vzorčnih ocen.

Ničelne domneve ne zavrnemo, če razlika ni značilna.

Primer 3. Primeri raziskovalnih domnev.

H_0 : Povprečna teža vranice je enaka 0,161 g.

H_1 : Povprečna teža vranice je manjša od 0,161 g.

ali

H_0 : Povprečna teža vranice mišk z vstavljenim genom se ne razlikuje od povprečne teže vranice mišk brez vstavljenega gena.

H_1 : Povprečna teža vranice mišk z vstavljenim genom je večja od povprečne teže vranice mišk brez vstavljenega gena.

ali

H_0 : Količini glukoze v krvi mišk pred štiriurnim postom in po njem se ne razlikujeta.

H_1 : Količina glukoze v krvi mišk po štiriurnem postu je večja od količine glukoze pred postom.

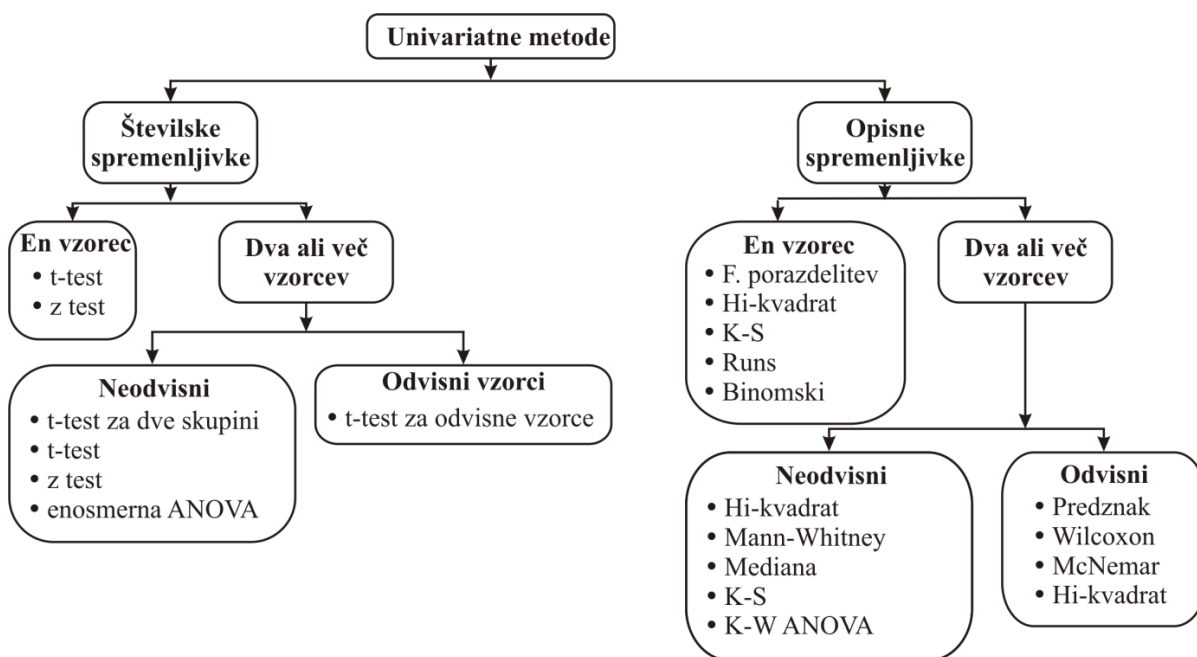
2 Klasifikacija statističnih metod

Najpogostejša je klasifikacija statističnih metod v dve skupini: univariatne in multivariatne metode. Univariatne metode so primerne za analizo podatkov, kadar proučujemo pri vsaki enoti le eno značilnost (spremenljivko). Multivariatne metode pa uporabimo za hkratno analizo več značilnosti, torej istočasno analiziramo več spremenljivk. Obe skupini metod se razlikujeta tudi v tem, da se univariatne metode ukvarjajo z analizo povprečij in variance, medtem ko se multivariatne analize osredotočajo na proučevanje ravni zveze med spremenljivkami (korelacija, kovarianca).

Nadaljnja klasifikacija univariatnih metod je prikazana na sliki 3. Iz nje je razvidno, da je izbor ustrezne metode odvisen od:

1. značilnosti spremenljivke, ki jo analiziramo: številska ali opisna
2. števila vzorcev
3. povezave med vzorci: neodvisni ali odvisni.

Dva vzorca sta neodvisna, kadar so vzorčne enote vzete iz dveh različnih statističnih množic (nobena enota iz prvega vzorca ni hkrati tudi v drugem vzorcu). Kadar isto skupino statističnih enot proučujemo v različnih razmerah, govorimo o odvisnih vzorcih (v obeh vzorcih so iste enote).



Slika 3. Klasifikacija univariatnih statističnih metod.

3 Preverjanje domnev v enem vzorcu

Proučujemo eno spremenljivko in zanima nas, ali je njena povprečna vrednost enaka neki vnaprej določeni ali standardni vrednosti. Postavimo ničelno domnevo:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

in možne nasprotne domneve:

$$H_1: \mu > \mu_0$$

$$H_1: \mu < \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

kjer je μ povprečna vrednost spremenljivke v statistični množici in μ_0 vnaprej določena ali standardna vrednost. Ničelno domnevo preverimo s t -testom za en vzorec (One Sample t test) ali z z -testom, kadar poznamo standardni odklon spremenljivke v statistični množici. Testna statistika t oziroma z sta definirani tako:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{se(\bar{x})} \quad z = \frac{\bar{x} - \mu_0}{se(\bar{x})}$$

$$se_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \quad se(\bar{x}) = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}.$$

Primer 4. Preverjanje povprečne teže vranice v enem vzorcu.

Preveriti želimo, ali je povprečna teža vranice trimesečnih mišk v populaciji manjša od 0,161 g. Raziskovalno vprašanje prevedemo v ničelno (H_0) in raziskovalno domnevo (H_1).

$$H_0: \mu = 0,161$$

$$H_1: \mu < 0,161$$

Veljavnost H_0 smo preverili s t -testom za en vzorec, dobljeni rezultati so podani v preglednici 2.

Preglednica 2. Rezultati t -testa za en vzorec.

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Vranica_teza	20	,155050	,0144458	,0032302

One-Sample Test						
	Test Value = 0.161					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Vranica_teza	-1,842	19	,081	-,0059500	-,012711	,000811

Vzorčna povprečna teža vranice trimesečnih mišk znaša 0,15505 g (Mean). Povprečna razlika med vzorčno povprečno težo in predpisano težo je -0,00595 g (MeanDifference). Ničelno domnevo smemo zavrniti, saj je $p < 0,05$ (ker je raziskovalna domneva enostranska, p za dvostransko domnevo /Sig 2-tailed/ delimo z dva). S p označujemo stopnjo tveganja, da se zmotimo, če ničelne domneve ne sprejmemo. Če je to tveganje manjše od maksimalno dopustnega tveganja, potem ničelne domneve ne potrdimo. Maksimalno dopustno tveganje je zgornja meja za α (stopnja značilnosti testa), pri kateri domnevo H_0 zavrnemo. Iz dobljenih rezultatov smemo sklepati, da je povprečna teža vranice trimesečnih mišk v statistični množici manjša od 0,161 g.

4 Parametrični testi

Parametrične teste uporabljamo za preizkušanje domnev o enakosti povprečnih vrednosti, ko so proučevane spremenljivke normalno porazdeljene.

4.1 Preizkušanje domneve o razliki med dvema aritmetičnima sredinama za neodvisna vzorca

Neodvisna vzorca vzamemo iz dveh različnih statističnih množic z $N1$ in $N2$ enotami. Proučevana spremenljivka X je normalno porazdeljena z $X_1: N(\mu_1, \sigma_1^2)$, in $X_2: N(\mu_2, \sigma_2^2)$, zato smemo za preverjanje ničelne domneve uporabiti parametrični test.

Postavimo ničelno domnevo

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

in možne nasprotne domneve:

$H_1: \mu_1 < \mu_2$
 $H_1: \mu_1 > \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Ničelno domnevo preverimo s t -testom za dva neodvisna vzorca. Testna statistika t je enaka:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{se(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}.$$

Izračun ocene standardne napake razlike aritmetičnih sredin ($se(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$) je odvisen od tega ali je variabilnost spremenljivke X v obeh množicah enaka ($\sigma_1^2 = \sigma_2^2$) ali ne.

Primer 6. t -test za dva neodvisna vzorca.

Z našo raziskavo želimo med drugim preveriti tudi, ali dejavnik 'vstavljeni gen' vpliva na razvoj tumorja na vranici.

Razvoj tumorja na vranici smo merili s težo vranice v gramih in ji priredili spremenljivko 'Vranica_teza'. Dejavniku vstavljenega gena smo priredili spremenljivko 'Fenotip' z dvema vrednostma: plus, če ima miška vstavljeni gen, in minus, če ga nima. Statistično množico smo razdelili v dva dela in pridobili dva slučajna vzorca. V prvem so bile miške z vstavljenim genom in v drugem brez vstavljenega gena. Z ničelno domnevo trdimo, da vstavljeni gen ne vpliva na težo vranice in je zato povprečna teža vranice v obeh statističnih množicah enaka. Z raziskovalno hipotezo pa predpostavljamo, da vstavljeni gen vpliva na razvoj tumorja na vranici in je zato povprečna teža vranice mišk z vstavljenim genom večja od povprečne teže vranice mišk brez vstavljenega gena. Zapišimo ničelno in raziskovalno domnevo:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 > \mu_2$

Veljavnost ničelne domneve smo preverili s programom SPSS 19 in 'Independent-Samples T tests'. Dobljeni izpisi so podani v preglednici 3.

Preglednica 3. t -test za dva neodvisna vzorca.

Group Statistics					
Fenotip		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Vranica_teza	Plus	92	,560609	,7212541	,0751959
	Minus	69	,156290	,0917803	,0110490

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Vranica_teza	Equal variances assumed	77,010	,000	4,625	159	,000	,4043188	,0874212	,2316624	,5769753
	Equal variances not assumed			5,320	94,913	,000	,4043188	,0760034	,2534313	,5552064

Vzorčna ocena povprečne teže vranice mišk z vgrajenim genom je 0,561 g (zaokroženo na tri decimalna mesta) in 0,156 g za miške brez vgrajenega gena. Variabilnost teže vranice je v prvem vzorcu (standardni odklon je 0,721) večja od variabilnosti v drugem vzorcu (standardni odklon je 0,092), kar potrjuje tudi test enakosti varianc (Levene's Tests for Equality of Variances). Iz rezultatov testa enakosti varianc izhaja, da ničelno domnevo o enakosti varianc v obeh statističnih množicah

$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$

zavrnamo pri $p < 0,001$. Zato bomo rezultate t -testa odčitali v vrstici, ki predpostavlja neenakost varianc v vzorcih (Equalvariances not assumed). Razlika med povprečnima vrednostma je 0,404 (MeanDifference) in je statistično značilna pri $p < 0,001$. (Izpisana vrednost za p , podana v stolpcu

'Sig', je zaokrožena na tri decimalna mesta enaka nič, ker je četrta decimalna manjša od 5. Zato vzamemo za zgornjo mejo 0,001.)

Iz dobljenih rezultatov smemo sklepati, da je razlika med povprečnima vrednostma statistično značilna pri $p < 0,001$ in da je razlika nastala zaradi vgrajenega genoma. Ti rezultati dovoljujejo zaključek, da vgrajeni genom vpliva na razvoj tumorja na vranici.

4.2 Preizkušanje domneve o razliki med dvema aritmetičnima sredinama za dva odvisna vzorca

Vzorčne enote pripadajo isti statistični množici, vendar se vrednosti spremenljivke X_1 nanašajo na stanje pred izvedbo nekega ukrepa ali poskusa in vrednosti spremenljivke X_2 na stanje po izvedbi tega ukrepa ali poskusa. Zanima nas, ali se zaradi ukrepa ali poskusa aritmetična sredina spremenljivke X_1 razlikuje od aritmetične sredine spremenljivke X_2 . Razlika med vrednostjo X_1 in X_2 pri vzorčni enoti i je enaka:

$$d_i = x_{i1} - x_{i2}$$

Postavimo ničelno domnevo

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0 \text{ oziroma}$$

$$H_0: \mu_d = 0$$

in možne alternativne domneve

$$H_1: \mu_d < 0$$

$$H_1: \mu_d > 0$$

$$H_1: \mu_d \neq 0,$$

kjer je μ_d aritmetična sredina razlik med vrednostmi spremenljivke X_1 in X_2 ter t -testna statistika, s katero preverjamo ničelno domnevo, in je enaka:

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{se(\bar{d})} = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_d} \sqrt{n} \quad \text{pri } n-1 \text{ stopinjah prostosti.}$$

Z $\bar{d}$ smo označili oceno aritmetične sredine razlik d_i , ki je enaka $x_{i1} - x_{i2}$.

Primer 6. Preverjanje razlik med povprečnima vrednostma za dva odvisna vzorca.

Vzemimo hipotetični primer, v katerem proučujemo količino glukoze v krvi pri miškah z izbitim genom za ghrelin (G-/-) pred štiriurnem postom in po njem. Normalna količina glukoze v krvi je med 60 in 130 mg/dl. Količino glukoze v krvi smo pri miškah v vzorcu izmerili pred postom (spremenljivka G_{pred}) in po postu (spremenljivka G_{po}). Obe spremenljivki sta normalno porazdeljeni. Predpostavljamo, da bodo po postu miške tega tipa imele povečano količino glukoze v krvi, ki bo presegla zgornjo mejo predpisanega intervala za normalne količine glukoze v krvi (130 mg/dl).

Preverjamo:

$$H_0: \mu_{pred} - \mu_{po} = 0$$

$$H_1: \mu_{pred} - \mu_{po} < 0 \text{ in } \mu_{po} > 130,$$

kjer je μ_{pred} povprečna količina glukoze v krvi pred postom in μ_{po} povprečna količina po postu. S parametričnim testom za dva odvisna vzorca preverimo ničelno domnevo in dobimo rezultate, izpisane v preglednici 4. Za miške v vzorcu velja, da je njihova povprečna količina glukoze v krvi pred postom (G_{pred}) znašala 120,85 mg/dl, po postu pa (G_{po}) 172,65 mg/dl. Po postu se je pri vzorčnih miškah v vzorcu povprečna količina glukoze povečala za 51,8 mg/dl. Povečanje količine glukoze v krvi je statistično značilno pri $p < 0,001$, zato ne smemo sprejeti ničelne domneve.

Preglednica 4. Rezultati parametričnega testa za dva odvisna vzorca za miške divjega tipa.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	G_pred	120,85	20	6,808	1,522
	G_po	172,65	20	8,054	1,801

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	G_pred - G_po	-51,800	9,919	2,218	-56,442	-47,158	-23,356	19	,000

Preveriti moramo še, ali je količina glukoze v krvi po postu večja od zgornje meje (130 mg/dl), kar storimo s:

$$H_0: \mu_{po} = 130$$

$$H_1: \mu_{po} > 130.$$

S t -testom za en vzorec dobimo, da je $p < 0,001$, zato tudi to ničelno domnevo zavrnilimo. Oba zaključka nam dovoljujeta sklep, da se pri miškah z izbitim genom za ghrelin (G-/-) zaradi posta poveča količina glukoze v krvi, in to prek zgornje meje intervala normalnih količin.

4.3 Preizkušanje domneve o enakosti več aritmetičnih sredin za neodvisne vzorce z analizo variance (one-way ANOVA)

Spremenljivko X opazujemo v k -vzorcih, ki smo jih vzorčili iz k -medsebojno neodvisnih statističnih množic. Predpostavimo, da je X normalno porazdeljena spremenljivka in da je variabilnost v vseh statističnih množicah enaka. Preverili bomo domnevo o enakosti aritmetičnih sredin v vseh k -vzorcih, torej

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \quad k > 2$$

H_1 : vsaj dve povprečni vrednosti nista enaki.

Celotno variiranje spremenljivke X (SS_x) lahko razčlenimo v:

- variiranje med skupinami – SS_k
- variiranje znotraj skupin – SS_e

$$SS_x = SS_k + SS_e$$

kjer je:

$$SS_k = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2,$$

$$SS_e = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2.$$

kjer pomeni: $\bar{x}_j$ – oceno aritmetične sredine spremenljivke X v vzorcu j ; $\bar{x}$ – oceno aritmetične sredine spremenljivke X , izračunano kot povprečje vzorčnih aritmetičnih sredin iz vseh k vzorcev; x_{ij} – vrednost spremenljivke X pri enoti i in vzorcu j ; n_j – velikost vzorca j ; k – število vzorcev.

Ocena variance med skupinami je: $s_k^2 = \frac{SS_k}{k-1}$, ocena variance znotraj skupin pa: $s_e^2 = \frac{SS_e}{n-k}$.

$$F = \frac{s_k^2}{s_e^2}$$

Testno statistiko F , s katero preverjamo ničelno domnevo, izračunamo z: $F = \frac{s_k^2}{s_e^2}$. Ničelno domnevo zavrnemo, če izračunana vrednost testne statistike F ni manjša od teoretične vrednosti pri $(k-1)$ in $(n-k)$ stopinjah prostosti.

Primer 7. ANOVA – testiranje povprečnih vrednosti med več vzorci.

Z našo raziskavo želimo preveriti tudi, ali starost mišk vpliva na razvoj tumorjev na vranici. Težo vranice smo preverjali pri starosti 3, 6, 12 in 18 mesecev (spremenljivko smo poimenovali 'starost'). Zato smo vzorčne miške razvrstili v štiri vzorce glede na njihovo starost. Razvoj tumorja na vranici smo merili s težo vranice v gramih in ji priredili spremenljivko 'Vranica_teza'. Odgovor na zastavljeno raziskovalno vprašanje smo poiskali s preverjanjem naslednje osnovne domneve:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H_1 : vsaj dve povprečni vrednosti nista enaki.

Z ničelno domnevo trdimo, da imajo miške pri izbranih starostih enako povprečno težo vranice. Veljavnost ničelne domneve smo preverili s programom SPSS in One-way ANOVA (preglednica 5).

Preglednica 5. Rezultati analize variance.

Descriptives								
Vranica_teza								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3 mesece	20	,155050	,0144458	,0032302	,148289	,161811	,1200	,1700
6 mesecev	21	,143429	,0336951	,0073529	,128091	,158766	,0800	,1900
12 mesecev	65	,153815	,0939416	,0116520	,130538	,177093	,0480	,7600
18 mesecev	55	,840891	,8230315	,1109775	,618394	1,063387	,1240	3,3200
Total	161	,387329	,5828659	,0459363	,296610	,478049	,0480	3,3200

ANOVA					
Vranica_teza					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17,187	3	5,729	24,199	,000
Within Groups	37,170	157	,237		
Total	54,357	160			

Iz povprečnih vrednosti (Mean) razberemo, da se ocene povprečne teže vranice ne razlikujejo veliko pri miškah, starih 3, 6 in 12 mesecev, da se pa ocena povprečne teže zelo poveča pri starosti 18 mesecev. Rezultati F -testa v preglednici ANOVA kažejo, da smemo ničelno domnevo o enakosti povprečnih vrednosti zavrniti pri $p < 0,001$, kar pomeni, da smemo sklepati, da sta statistično značilno različni vsaj dve povprečni vrednosti. Odgovor na to, katere povprečne vrednosti se med seboj značilno razlikujejo, dobimo s Post Hoc Multiple Comparison testom, ki primerja med seboj vse možne pare povprečnih vrednosti. Če izberemo najpogostejše uporabljeni Tuckeyev test, dobimo podatke o povprečnih razlikah med vsemi možnimi starostnimi skupinami spremenljivke 'Starost' (preglednica 6).

Iz preglednice 6 je razvidno, da se povprečna teža vranice mišk, starih 18 mesecev, značilno razlikuje od povprečne teže vranice mišk, starih 3, 6 in 12 mesecev. Značilne razlike so v stolpcu 'MeanDifference I-J' označene z *, če je v stolpcu 'Sig.' $p < 0,05$, kar nam omogoči hitrejše odkrivanje značilnih razlik.

Preglednica 6. Primerjava povprečnih vrednosti.

Multiple Comparisons

Vranica_teza
Tukey HSD

(I) Starost	(J) Starost	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
3 mesece	6 mesecev	,0116214	,1520246	1,000	-,383150	,406393
	12 mesecev	,0012346	,1244184	1,000	-,321850	,324319
	18 mesecev	-,6858409*	,1270518	,000	-1,015764	-,355918
6 mesecev	3 mesece	-,0116214	,1520246	1,000	-,406393	,383150
	12 mesecev	-,0103868	,1221320	1,000	-,327534	,306761
	18 mesecev	-,6974623*	,1248138	,000	-1,021574	-,373351
12 mesecev	3 mesece	-,0012346	,1244184	1,000	-,324319	,321850
	6 mesecev	,0103868	,1221320	1,000	-,306761	,327534
	18 mesecev	-,6870755*	,0891455	,000	-,918565	-,455586
18 mesecev	3 mesece	,6858409*	,1270518	,000	,355918	1,015764
	6 mesecev	,6974623*	,1248138	,000	,373351	1,021574
	12 mesecev	,6870755*	,0891455	,000	,455586	,918565

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

5 Analiza variance po več faktorjih (n-smerna analiza variance)

Kadar nas zanima hkratni vpliv več opisnih spremenljivk na vrednost številske spremenljivke X uporabimo n -smerno analizo variance. Vzemimo, da proučujemo vpliv dveh spremenljivk.

Celotno variiranje spremenljivke X razčlenimo v:

- variiranje zaradi prve spremenljivke (SS_{x_1});
- variiranje zaradi druge spremenljivke (SS_{x_2});
- variiranje zaradi skupnega vpliva obeh spremenljivk (SS_{x_1, x_2});
- variiranje znotraj skupin (SS_e).

Večji vpliv prve spremenljivke se bo pokazal v večji povprečni razliki med njenimi skupinami in v večji vrednosti SS_{x_1} . Podobno velja za drugo spremenljivko.

Primer 8. Dvosmerna analiza variance.

V dosedanjih analizah smo proučevali, ali so razlike med povprečnimi težami vranice posledica vgrajenega gena ali starosti mišk. Sedaj pa bomo razlike v povprečnih vrednostih proučevali z upoštevanjem obeh spremenljivk hkrati.

S programom SPSS 19 smo dobili najprej ocene povprečne vrednosti in standardnih odklonov za vseh osem vzorcev (preglednica 7).

Preglednica 7. Rezultati analize variance z dvema faktorjema.

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Vranica_teza

Starost	Fenotip	Mean	Std. Deviation	N
3 mesece	Plus	,159800	,0104860	10
	Minus	,150300	,0167468	10
	Total	,155050	,0144458	20
6 mesecev	Plus	,145500	,0310849	12
	Minus	,140667	,0386620	9
	Total	,143429	,0336951	21
12 mesecev	Plus	,186690	,1288854	29
	Minus	,127333	,0350893	36
	Total	,153815	,0939416	65
18 mesecev	Plus	1,044341	,8593506	41
	Minus	,245071	,1691924	14
	Total	,840891	,8230315	55
Total	Plus	,560609	,7212541	92
	Minus	,156290	,0917803	69
	Total	,387329	,5828659	161

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Vranica_teza

Fenotip	Starost	Mean	Std. Deviation	N
Plus	3 mesece	,159800	,0104860	10
	6 mesecev	,145500	,0310849	12
	12 mesecev	,186690	,1288854	29
	18 mesecev	1,044341	,8593506	41
	Total	,560609	,7212541	92
Minus	3 mesece	,150300	,0167468	10
	6 mesecev	,140667	,0386620	9
	12 mesecev	,127333	,0350893	36
	18 mesecev	,245071	,1691924	14
	Total	,156290	,0917803	69
Total	3 mesece	,155050	,0144458	20
	6 mesecev	,143429	,0336951	21
	12 mesecev	,153815	,0939416	65
	18 mesecev	,840891	,8230315	55
	Total	,387329	,5828659	161

Zaradi hkratnega upoštevanja obeh spremenljivk je celotni vzorec razdeljen v osem vzorcev, saj imamo 4 starostne skupine ter 2 možni vrednosti spremenljivke Fenotip (opisani v primeru 1) in za vsak vzorec je izračunana ocena povprečne vrednosti in standardnega odklona, kar je podano v izpisu 'DescriptiveStatistics'. Iz preglednic je razvidno, da je ocena povprečne teže trimesečnih mišk z vgrajenim genom 0,1598 g in 0,1503 g brez vgrajenega gena ter da je ocena povprečne teže trimesečnih mišk 0,15505 g.

Preglednica 8: Analiza vplivov.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Vranica_teza					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23,911 ^a	7	3,416	17,166	,000
Intercept	8,757	1	8,757	44,009	,000
Fenotip	1,379	1	1,379	6,931	,009
Starost	7,195	3	2,398	12,052	,000
Fenotip * Starost	4,330	3	1,443	7,252	,000
Error	30,446	153	,199		
Total	78,511	161			
Corrected Total	54,357	160			

a. R Squared = ,440 (Adjusted R Squared = ,414)

V preglednici 8 'Tests of Between-Subjects Effects' so podani rezultati F-testov, s katerimi preverjamo vpliv posameznih spremenljivk (Starost in Fenotip) in njun medsebojni vpliv (Starost*Fenotip) na težo vranice.

Za spremenljivko 'Starost' smo z F -testom preverjali domnevi:

H_0 : Ne obstajajo razlike med povprečnimi težami vranice glede na štiri starostne skupine spremenljivke 'Starost'.

H_1 : Pri vsaj dveh starostnih skupinah se povprečni teži vranice razlikujeta.

Vrednost $F(3;153) = 12,052$ in $p < 0,001$ nam dovoljujeta sklep, da starost mišk vpliva na težo vranice.

Za spremenljivko 'Fenotip' smo z F -testom preverjali domnevi:

H_0 : Povprečni teži vranice se ne razlikujeta glede na fenotip miške.

H_1 : Povprečni teži vranice se razlikujeta glede na fenotip miške.

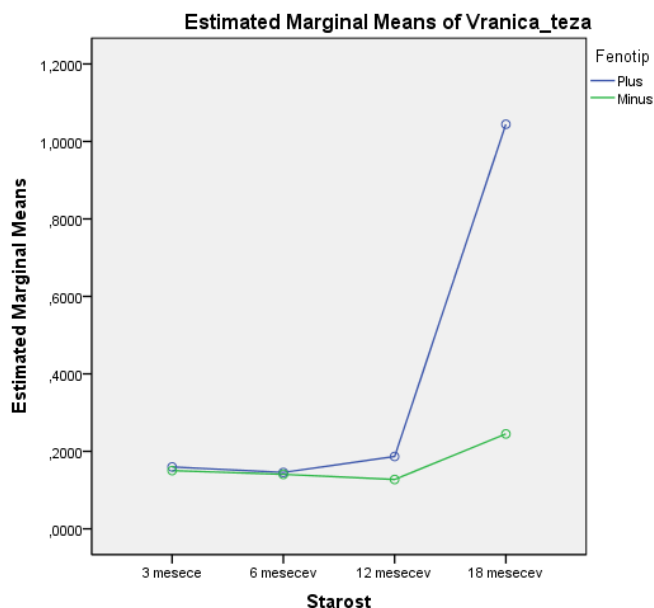
Vrednost $F(1;153) = 6,931$ in $p = 0,009$ nam dovoljujeta sklep, da fenotip miške vpliva na težo vranice.

V preglednici 'Tests of Between-Subjects Effects' pa najdemo tudi rezultate F -testa za medsebojni vpliv obeh proučevanih spremenljivk (Fenotip*Starost), s katerim smo preverjali:

H_0 : Ne obstaja medsebojni vpliv obeh spremenljivk na težo vranice.

H_1 : Obstaja medsebojni vpliv obeh spremenljivk na težo vranice.

Vrednost $F(3;153) = 7,252$ in $p < 0,001$ nam dovoljujeta zaključek, da obstaja tudi medsebojni vpliv obeh spremenljivk. Obstajajo namreč kombinacije vrednosti obeh spremenljivk, pri katerih je povprečna teža vranice značilno različna od povprečne teže pri drugih kombinacijah. Do enakega zaključka lahko pridemo tudi s pomočjo slike 4, iz katere je razvidno, da je povprečna teža vranice značilno večja pri kombinaciji 'starost je 18 mesecev in fenotip je plus' kot pri ostalih kombinacijah. Obe spremenljivki in njun medsebojni vpliv skupaj razložijo 41,4 % variabilnosti spremenljivke 'Vranica_teza' (vrednost Adjusted R Squared = 0,414).



Slika 4. Povprečne vrednosti za različne skupine spremenljivke 'Starost' in 'Fenotip'.

6 Neparametrični testi

Neparametrične teste uporabljamo za ugotavljanje razlik med povprečnimi vrednostmi za opisne spremenljivke, ki jih merimo na ordinalni lestvici, ali za številске spremenljivke, katerih vrednosti niso normalno porazdeljene.

6.1 Neparametrični testi za en vzorec

S Kolmogorov-Smirnovim neparametričnim testom za en vzorec preverjamo ničelno domnevo:

H_0 : Porazdelitev obravnavane spremenljivke se pokorava značilnostim izbrane teoretične porazdelitve.
 H_1 : Porazdelitev obravnavane spremenljivke se NE pokorava značilnostim izbrane teoretične porazdelitve.

Pri preverjanju ničelne domneve se primerja opazovana porazdelitev vrednosti spremenljivke X z določeno teoretično porazdelitvijo, na primer normalno porazdelitvijo z enako aritmetično sredino in standardnim odklonom, kot jo ima spremenljivka X . Če je test neznačilen ($p > 0,05$), tedaj sklepamo, da je proučevana porazdelitev podobna normalni porazdelitvi. Kolmogorov-Smirnov test se uporablja še za preverjanje, ali je proučevana porazdelitev eksponentna, enakomerna ali Poissonova.

Primer 9. Primerjanje porazdelitve spremenljivke 'G_po' z normalno porazdelitvijo.

Za spremenljivko 'G_po' želimo preveriti, ali se pokorava značilnostim normalne porazdelitve. V ta namen smo izračunali kazalce opisne statistike, narisali njeno sliko in naredili Kolmogorov-Smirnov test.

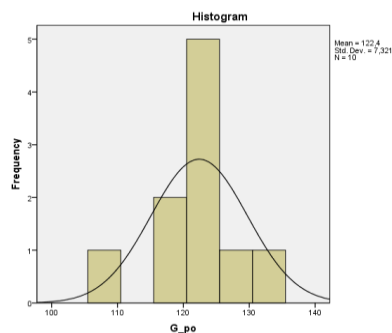
Ocene povprečne vrednosti (Mean=122,40), mediane (Median=122,50) in modusa (Mode=122) so približno enake, kar kaže na podobnost porazdelitve vrednosti spremenljivke 'G_po' z normalno porazdelitvijo (preglednica 9). Pri normalni porazdelitvi sta koeficient sploščenosti (Kurtosis) in koeficient asimetrije (Skewness) enaka nič. Koeficienta pri porazdelitvi spremenljivke 'G_po' nista

enaka nič, vendar pa njuni vrednosti nista veliki (preglednica 9). Negativni koeficient asimetrije pri spremenljivki 'G_po' kaže na asimetričnost njene porazdelitve v levo, pozitivni koeficient sploščenosti pa, da je porazdelitev 'G_po' višja od primerljive normalne porazdelitve. Na sliki 5 je še grafično prikazana porazdelitev spremenljivke 'G_po' in graf normalne porazdelitve, ki ima enako povprečno vrednost in standardni odklon kot porazdelitev 'G_po'. Ničelno domnevo smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom za en vzorec in je ne smemo zavrniti, saj je test neznačilen ($p = 0,909$). Vsi dobljeni rezultati nam dovoljujejo sklep, da porazdelitev spremenljivke 'G_po' ne odstopa bistveno od normalne porazdelitve (preglednica 9, preglednica 10 in slika 5).

Preglednica 9. Kazalci opisne statistike za spremenljivko G_po.

Statistics		
G_po		
N	Valid	10
	Missing	0
Mean		122,40
Median		122,50
Mode		122
Std. Deviation		7,321
Skewness		-,272
Std. Error of Skewness		,687
Kurtosis		1,192
Std. Error of Kurtosis		1,334

Slika 5. Porazdelitev spremenljivke G_po.



Preglednica 10. Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		G_po
N		10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	122,40
	Std. Deviation	7,321
Most Extreme Differences	Absolute	,178
	Positive	,161
	Negative	-,178
Kolmogorov-Smirnov Z		,564
Asymp. Sig. (2-tailed)		,909

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Neparametrični testi za ugotavljanje značilnih razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca

Mann-Whitney U-test in Wilcoxon W-test uporabljamo za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca, ko proučevana številska spremenljivka ni normalno porazdeljena ali za opisne spremenljivke, merjene na ordinalni lestvici. Testa predstavljata neparametrična ekvivalenta parametričnemu t -testu. Pri obeh testih se vrednosti številske ali opisne spremenljivke pretvorijo v range, tako da se najmanjši vrednosti pripiše rang 1, naslednji najmanjši rang 2, itd. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov.

Pri Wilcoxon W-testu je testna statistika W_s enaka manjši vsoti rangov pri enako velikih vzorcih oziroma je enaka vsoti rangov iz manjšega vzorca, ko vzorca nista enako velika. Vrednost statistike W_s je statistično značilna, če je njena absolutna standardizirana vrednost z večja od 1,96 ($p < 0,05$). Njena standardizirana vrednost je opredeljena z:

$$z = \frac{W_s - \overline{W_s}}{SE_{W_s}},$$

kjer je $\overline{W_s}$ povprečna vrednost testne statistike in SE_{W_s} njena standardna napaka. Njuni vrednosti izračunamo z:

$$\overline{W_s} = \frac{n_1(n_1 + n_2 + 1)}{2}$$

$$SE_{W_s} = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}.$$

kjer sta n_1 in n_2 velikost prvega oziroma drugega vzorca.

Man-Whitney U-test temelji na testni statistiki U, opredeljeni za vzorec i z:

$$U_i = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_i,$$

kjer je R_i vsota rangov iz vzorca i .

Primer 10. Analiza povprečij z neparametričnimi testi.

Vzemimo, da spremenljivka 'Vranica_teza' ni normalno porazdeljena. Zato bomo analizo razlik med povprečnimi vrednostmi te spremenljivke glede na dve možni vrednosti spremenljivke 'Fenotip' naredili z Mann-Whitney U-testom in Wilcoxon W-testom, ki spadata med neparametrične teste (preglednica 11).

Preglednica 11. Analiza povprečnih vrednosti z neparametričnim testom.

Ranks				
	Fenotip	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Vranica_teza	Plus	92	98,16	9031,00
	Minus	69	58,12	4010,00
	Total	161		

Test Statistics ^a	
	Vranica_teza
Mann-Whitney U	1595,000
Wilcoxon W	4010,000
Z	-5,395
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: phenotip

V preglednici 'Ranks' sta za vsako skupino med drugim podana tudi povprečna ranga (MeanRank). Ker je rang 1 dodeljen najmanjši in največji rang največji vrednosti, smemo iz povprečnih rangov domnevati, da je povprečna teža vranice večja v skupini z večjim povprečnim rangom, to je v skupini z vgrajenim genom (Fenotip plus). Izpisani rezultati v preglednici 'Test Statistics' pa dovoljujejo zaključek, da je razlika med obema povprečnima vrednostma statistično značilna pri $p < 0,001$ (Asymp. Sig); torej ni nastala slučajno ampak zaradi različnega fenotipa mišk.

Z neparametričnim Kruskal Wallis testom za k neodvisnih vzorcev smo naredili še analizo povprečnih vrednosti spremenljivke 'Vranica teza' glede na različne starostne skupine. Na osnovi dobljenih rezultatov smemo sklepati, da sta v vsaj dveh starostnih skupinah povprečni teži vranic različni (preglednica 12).

Preglednica 12. Analiza povprečij za spremenljivko 'starost'.

Ranks			
	Starost	N	Mean Rank
Vranica_teza	3 mesece	20	70,33
	6 mesecev	21	57,74
	12 mesecev	65	52,86
	18 mesecev	55	127,02
	Total	161	

Test Statistics ^{a, b}	
	Vranica_teza
Chi-Square	83,578
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable:
Starost

6.3 Neparametrični test za ugotavljanje značilnih razlik med dvema povprečnima vrednostma za odvisna vzorca

Je neparametrični ekvivalent parametričnemu t-testu za dva odvisna vzorca. Za preverjanje razlik med dvema odvisnima vzorcema uporabljamo Wilcoxon signed-rank test, ki temelji na razlikah med pari vrednosti spremenljivke pri istih enotah. Razlika z najmanjšo absolutno vrednostjo dobi rang ena, razlika z drugo najmanjšo absolutno vrednostjo rang dve in tako naprej do največje razlike. Razlike z vrednostjo nič se pri razvrščanju ne upoštevajo. Tvorita se dve vsoti rangov, in sicer vsota rangov, ki pripadajo pozitivnim razlikam, in vsota rangov, ki pripadajo negativnim razlikam. Med obema vsotama izberemo manjšo in ta določa vrednost testne statistike T, ki je statistično značilna pri $p < 0,05$, če je njena absolutna standardizirana vrednost z večja od 1,96. Ta je opredeljena z:

$$z = \frac{T - \bar{T}}{SE_T},$$

kjer je $\bar{T}$ povprečna vrednost testne statistike in SE_T njena standardna napaka. Njuni vrednosti izračunamo z:

$$\bar{T} = \frac{n(n+1)}{4}$$

$$SE_T = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}},$$

kjer n pomeni velikost vzorca.

Primer 11. Testiranje razlik med povprečnima vrednostma v odvisnih vzorcih.

Vzemimo še enkrat hipotetični primer, opisan v primeru 7. Količino glukoze pred postom (LG_pred) in po postu (LG_po) smo merili pri miškah s spremenjenimi geni (L-/-). Vrednosti spremenljivk LG_pred in LG_po nista normalno porazdeljeni, kar bomo preverili z:

$$H_0: \mu_{pred} - \mu_{po} = 0$$

$$H_1: \mu_{pred} - \mu_{po} < 0$$

Domnevi bomo preverili z neparametričnim testom za dva odvisna vzorca. Povprečna količina glukoze pred postom znaša 138,00 ng/ml, po postu pa 177,60ng/ml (preglednica 13). Iz preglednici 'Ranks' ugotovimo, da pri nobeni miški količina glukoze pred postom ni bila večja od količine po postu (število negativnih rangov je nič) in da pri nobeni miški količini glukoze pred postom ali po njem nista bili enaki. Torej, pri vseh 10 miškah je bila količina glukoze pred postom manjša od količine po postu (število pozitivnih rangov je 10). Iz rezultatov Wilcoxon Signed Ranks testa izhaja, da smemo zavrniti ničelno domnevo pri $p < 0,01$ in sprejeti domnevo H_1 . Pri miškah s spremenjenimi geni (L-/-) se po postu zviša količina glukoze v krvi.

Preglednica 13. Rezultati neparametričnega testa za odvisna vzorca.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
LG_pred	10	138,00	2,749	133	142
LG_po	10	177,60	8,222	162	191

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
LG_po - LG_pred Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
Positive Ranks	10 ^b	5,50	55,00
Ties	0 ^c		
Total	10		

a. LG_po < LG_pred

b. LG_po > LG_pred

c. LG_po = LG_pred

Test Statistics^b

	LG_po - LG_pred
Z	-2,823 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

LITERATURA

1. Bacchieri A, Della Cioppa G, eds. Fundamentals of clinical research: bridging medicine, statistics and operations. [Elektronski vir]. Milano : Springer, 2006.
2. Chakravarti IM, Laha RG, Roy J. Handbook of methods of applied statistics. Vol. 2. Planning of surveys and experiments. New York : John Willey & Sons, 1967.
3. Cleophas TJ, Cleophas TF, Zwinderman AH. Statistics applied to clinical trials. 3rd ed. [Elektronski vir]. Dordrecht : Springer, 2006.
4. Keller G, Warrack B. Statistics for management and economics. Pacific Grove : Duxbury Thomson Learning, 2000.
5. Kumar R. Research methodology: a step-by-step guide for beginners. London; Thousand Oaks (CA); New Delhi : Sage Publications, 2005.
6. Triola MF. Essentials of statistics. Boston : Addison-Wesley, 2011.

POSMRTNE SPREMEMBE

Posmrtne spremembe so spremembe v tkivih in organih, ki nastanejo po smrti organizma. Na nastanek in izraženost posmrtnih sprememb vplivajo kondicija, konstitucija, starost, vrsta, odlakanost oz. operjenost, zdravstveno stanje (npr. intravitalna bakterijska infekcija), telesna temperatura v času smrti in morebitno zdravljenje organizma, temperatura in drugi dejavniki okolja pred in po smrti organizma ter čas, ki je minil od smrti do raztelesbe.

Glavne posmrtne spremembe so:

- mrtvaška otrplost (*rigor mortis*),
- mrtvaški hlad (*algor mortis*),
- posmrtno strjevanje krvi (*coagulatio sanguinis postmortalis*),
- sesedanje krvi (*hypostasis*),
- obarvanje z barvili: krvna barvila, žolčna in eksogena barvila (*imbibitio*),
- avtoliza (*autolysis*),
- gnitje (*putrefactio*),
- izsuševanje (*mumificatio*),
- maceracija (*maceratio*),
- umiljenje (*saponificatio*).

Mrtvaška otrplost

Mrtvaška otrplost je posmrtni proces, ki se začne, nekaj časa traja in se konča. Nastane zaradi nezmožnosti razdruževanja aktinomiozinskih kompleksov v mišicah zaradi pomanjkanja ATP in kisika po smrti, popušča pa zaradi avtolitičnih in gnilobnih procesov v mišicah. Mrtvaška otrplost je odvisna od vrste mišičnine, stanja organizma pred smrtjo in vplivov zunanjih dejavnikov. Ločimo kataleptično mrtvaško otrplost in pravo mrtvaško otrplost.

Kataleptična mrtvaška otrplost nastane v času smrti. Truplo zato ostane fiksirano v položaju, v katerem je žival poginila. Kataleptična mrtvaška otrplost je zelo redka in nastopi pri poškodbah možganov, podaljšane hrbtenjače, srca in prsnega koša pri močno izčrpanih živalih.

Prava mrtvaška otrplost ne nastane takoj po smrti, saj neposredno po smrti nastopi mlahavost mišic. Glede na vrsto mišičnine ločimo mrtvaško otrplost skeletne, srčne in gladke mišičnine.

Mrtvaška otrplost **skeletne mišičnine** nastopi 2 do 8 ur po smrti in poteka po točno določenem redu. Pri descendentnem tipu ali Nystenovem vrstnem redu (večina živalskih vrst) najprej nastopi na trebušni preponi, nato na mišicah čeljusti, vratu, trupu, prednjih in nazadnje zadnjih nog. Pri ascendentnem tipu (kunci, zajci ipd.) pa nastopi najprej na zadnjih in nato na sprednjih okončinah. Traja 20 do 48 ur in popušča v enakem vrstnem redu, kot je nastala. Pri živalih, ki so bile zaradi bolezni ali dolgotrajnega stradanja zelo izčrpane, in živalih, ki imajo zelo dobro razvito mišičnino, nastopi mrtvaška otrplost prej in prej tudi popusti. Zelo hitro nastopi tudi pri zastrupitvi s strihninom, cianovodikovo kislino in pri tetanusu. Pri atrofijah in drugih degenerativnih boleznih mišičnine pa nastopi kasneje in je slabše izražena, še posebno če smrt ne nastopi takoj. Če mrtvaško otrplost mehansko prekinemo, ta nikoli več ne nastopi.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je mrtvaška otrplost skeletne mišičnine začela nastajati po dveh urah in bila popolnoma izražena še po 24 urah, nakar je začela popuščati. 48 ur po evtanaziji je popolnoma popustila.

Mrtvaška otrplost **srčne mišičnine** nastopi 1 do 2 uri po smrti, najprej na levem, nato desnem ventriklu, nazadnje na atrijih. Popusti po 20 do 30 urah. Degenerativna in vnetna obolenja miokarda preprečujejo nastanek mrtvaške otrplosti.

Mrtvaška otrplost **gladke mišičnine** nastopi v mediji srednje velikih in majhnih arterij, piloričnem delu želodca, sečnem mehurju, črevesju in očesu že 10 do 15 minut po smrti in je čez pol ure najbolj intenzivna. Popusti po 2 urah.

Čas nastanka in trajanje mrtvaške otrplosti sta odvisna tudi od temperature okolja. Pri višjih temperaturah nastopi in popusti prej.

Ohlajanje trupla

Temperatura trupla se po smrti postopno izenačuje s temperaturo okolja. Čas, ki je potreben za ohladitev trupla na zunanjo temperaturo, je odvisen od zunanje temperature, velikosti in kondicije ter odlakanosti ali operjenosti živali. Srednje velik pes se na zunanjo temperaturo 9 do 25 °C ohladi v 12 do 29 urah, izkožen pa v 12 do 14 urah.

Telesna temperatura laboratorijskih podgan, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, se je s temperaturo okolice izenčila že po 4 urah.

Strjevanje krvi

Posmrtno strjevanje krvi se začne v srcu in velikih krvnih žilah pol ure do uro po smrti. Krvni strdkci so lahko rdeči (*cruor*), beli (*crusta lardacea*) in mešani ter niso prilepljeni na intimo krvnih žil ali endokard.

Rdeči krvni strdek nastane zaradi hitre koagulacije krvi pri hitrem nastopu smrti. Krvni elementi ležijo v fibrinski mreži v enakem razmerju kot v krvi. Beli krvni strdek nastane pri upočasnjem krvnem obtoku pri počasnem nastopu smrti. Sestavljen je iz fibrina, v katerem so levkociti in trombociti. Mešani krvni strdek nastane pri agonalnem strjevanju krvi, pri čemer se krvni elementi razslojijo – eritrociti oblikujejo debelejšo plast na dnu strdka, levkociti oblikujejo sivkasto plast na sredini, na vrhu pa je rumenkasta plast plazme s trombociti in levkociti.

Pri utopitvah, zadužitvah, kapi, zastrupitvah, evtanazijah, sepsah itd. ne pride do posmrtnega strjevanja krvi ali pa je kri slabo strjena.

Sesedanje krvi

Hipostaza je posledica gravitacijskega odtekanja še ne strjene krvi v ventralno ležeča tkiva in organe. Proces se lahko začne že med dolgotrajnim ležanjem zelo bolnih živali, pogosteje pa v agoniji. Najbolj je opazna v parnih organih in pljučih, pri čemer so ventralno ležeči organi ali deli organov temno rdeči. Pri nepigmentiranih živalih jo zlahka opazimo tudi na koži, ki je lahko difuzno rdeča, ali pa nastanejo mrliške lise (*livores mortis*) na spodaj ležečih delih kože, kjer ni neposrednega stika trupla s podlago.

Obarvanje z barvili

Tkiva in organi se po smrti pogosto obarvajo z barvili endogenega izvora, ki jih vsebujeta kri (krvna imbibicija) in žolč (žolčna imbibicija), ter barvili eksogenega izvora, ki jih vsebuje hrana.

Zaradi posmrtna hemolize se sprošča hemoglobin, ki rdeče obarva tkiva in organe. Krvna imbibicija je najbolj opazna na intimi krvnih žil ter okoliških tkivih in organih pri močni polnokrvnosti ter na endokardu in ostalih seroznih opnah srca ter seroznih opnah telesnih votlin in parenhimskih organih, če je v srcu in telesnih votlinah kri. Pri septikemijah lahko zaradi delovanja hemolitičnih bakterij, ki lizirajo kri, krvna imbibicija nastane že pred smrtjo živali.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je bila krvna imbibicija izražena že nekaj ur po evtanaziji na intimi velikih krvnih žil in srcu, močno pa je bila izražena na steni črevesja teden po usmrtnitvi.

Bilirubin in biliverdin sta agresivna žolčna pigmenta, ki hitro prepojita steno žolčnega mehurja in povzročita rumeno ali zeleno obarvanje jeter in segmentov tankega črevesa v okolici žolčnika. Žolčne imbibicije tankega črevesa ne smemo zamenjati z rumeno obarvanostjo, ki je lahko posledica peroralne aplikacije nekaterih zdravil (Teramycin).

Eksogeni pigmenti, ki jih žival zaužije z rastlinsko hrano, sluznice prebavi, najpogosteje predželodcev, želodca in črevesa, obarvajo zeleno ali rumeno.

Avtoliza

Avtoliza je digestija tkiv in organov s telesu lastnimi encimi in prebavnimi sokovi v aseptičnih pogojih. Najhitreje poteka v organih z visoko encimsko aktivnostjo, kot so trebušna slinavka, črevesna sluznica, ledvica, jetra in sredica nadobistnic, ki izgubijo karakteristično strukturo in postanejo mehkejša konsistence ter motni.

Avtoliza najhitreje poteka med 37 in 40 °C in pri pH med 4 in 6,7. Narkotiki inhibirajo avtolizo.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je bila avtoliza 48 ur po evtanaziji močno izražena na pankreasu in blago na ostalih parenhimskih organih, štiri dni po evtanaziji pa so bili vsi parenhimski organi močno avtolitični. Teden po evtanaziji so bili močno avtolitični vsi organi, 10 dni po evtanaziji pa zaradi močne avtolize skoraj nerazpoznavni.

Gnitje

Gnitje je posledica delovanja proteolitičnih encimov gnilobnih bakterij, ki so endogenega ali eksogenega izvora. Pri tem nastajajo spremembe v konsistenci tkiv in organov, ki postanejo mehkejši, luščenje vrhnjic, čemur pravimo kadaverska deskvamacija in je najbolj izraženo v prebavnem traktu, ter velike količine zelo smrdečih plinov, najpogosteje amoniaka in žveplovodika. Največ plinov nastane v želodcu in črevesju, kar imenujemo postmortalna timpanija ali meteorizem, kopičenju plinov v parenhimskih organih pa pravimo kadaverski emfizem. Posledica velikih količin plinov so spremembe v položaju organov, npr. posmrtni zasuk in vlek črevesja ter izpadi delov črevesja, maternice in sečnega mehurja iz trebušne votline (postmortalni prolapsus), in rupture predželodcev, želodca in črevesja s posledičnim izlitjem vsebine prebavnega trakta v trebušno votlino.

Pri prežvekovalcih lahko ekstremno kopičenje plina povzroči tudi rupturo diafragme in mišic ingvinalnega področja. Od podobnih sprememb, ki nastanejo intravitalno, jih razlikujemo po tem, da posmrtnih sprememb ne spremljajo krvavitve, znaki vnetja in spremembe v prekrvavljenosti.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je bil meteorizem črevesja zmerno izražen 48 ur po evtanaziji. Štiri dni po evtanaziji je bilo truplo podgane blago napihnjeno, meteorizem črevesja pa močno izražen. Teden po evtanaziji je bilo truplo podgane močno napihnjeno. Posledica gnitja je tudi psevdomelanoza, ki nastane zaradi vezave žveplovodika s hemoglobinom iz eritrocitov in obarva tkiva in organe sivo, temno zeleno in črno. Temno zeleno obarvanje je posledica nastajanja sulfmethemoglobina, sivočrno in temno sivo pa železovega sulfida. Psevdomelanoza najprej nastane na črevesju, želodcu in koži ter podkožju trebušne stene.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je psevdomelanoza najprej začela nastajati v podkožju trebuha, kjer je bila blago izražena 20 ur po evtanaziji. 48 ur po evtanaziji je bila psevdomelanoza močno izražena v podkožju trebuha ter blago v trebušni steni in črevesju. Štiri dni po evtanaziji je močna psevdomelanoza zajela celo podkožje, trebušno steno in črevesje in bila deseti dan po usmrtnitvi izražena na vseh notranjih organih.

Proces gnitja poteka zelo hitro v zelo toplem in vlažnem okolju, pri utopitvah in sepsah. Fenol, strihnin in ogljikov monoksid zaustavljajo gnitje. Močno zamaščena trupla in trupla mladih živali gnijejo hitreje kot shirana trupla in trupla starih živali. Počasneje gnijejo organi, ki imajo veliko strome in malo parenhima, ter pljuča, trombi in fibrin.

Izsuševanje trupla

Mumifikacija je spreminjanje trupla ali odmrlih tkiv in organov v čvrsto, usnjeno maso, podobno mumijam. Povzroči jo gibanje suhega in toplega zraka. Najpogosteje je izražena na jeziku, zunanjih sluznicah in veznicah ter pri odmrlih plodovih v maternici po predhodni resorpciji plodovih tekočin.

Pri laboratorijskih podganah, ki so poginule ležale na sobni temperaturi, je bila motnost roženic – posledica izsuševanja – popolnoma izražena po 20 urah.

Zmehčanje tkiva

Maceracija je zmehčanje tkiva v zelo vlažnem, sterilnem okolju. Najpogosteje macerira odmrli plod v maternici. Značilnosti maceracije so luščenje vrhnjic, rdečkasta tekočina v telesnih votlinah in sklepih, odpadanje dlak in utekočinjenje organov ter krvna imbibicija celega trupla, ki se razvije 12 ur po odmrtnosti.

Umiljenje

Umiljenje je posmortalni proces, pri katerem maščoba hidrolizira v glicerin in proste maščobne kisline, ki se kasneje pretvorijo v alkalne soli. Produktu umiljenja pravimo mrliški vosek.

Mrliški vosek nastane pri zelo zamaščenih truplih, ki so izpostavljena nizkim zunanjim temperaturam in visoki vlažnosti. Umiljenje najpogosteje nastane, ko zelo zamaščena trupla zakopljemo v zelo vlažno ilovico, ki ne prepušča zraka, pri čemer se lahko oblika trupla več let ohrani nespremenjena. Raziskave so pokazale, da lahko voda, ki je potrebna za hidrolizo maščob, izvira tudi iz telesu lastnih tkiv.

NAKLJUČNE NAJDBE MED RAZTELESBO

Med raztelesbo lahko v organih ali tkivih najdemo nekatere spremembe, ki imajo le majhen diagnostični pomen ali ga sploh nimajo ter jih zato lahko smatramo kot naključne najdbe. Poznavanje teh sprememb je pomembno, saj se pojavljajo relativno pogosto in zato nevesči ocenjevalec zlahka napačno interpretira njihov pomen.

Splošne spremembe in spremembe, ki jih najdemo pri zunanjem pregledu

- **Krvav nosni izcedek** je pogosta posmrtna sprememba, ki nastane zaradi polnokrvnosti sluznice nosne votline. Diferencialno diagnostično moramo to posmrtno spremembo ločiti od krvavitve iz nosne votline, počenega trunkusa pulmonalisa in krvavitve, povezane z vnetjem pljuč.
- **Bister, penast nosni izcedek in/ali izcedek iz ust** je pogosta sprememba, ki nastane, ko žival pogine s polnimi pljuči zraka in se po prenehanju dihanja pojavi še nekaj srčnih utripov. Diferencialno diagnostično moramo to posmrtno spremembo ločiti od pljučnega edema.
- **Melanoza** je temno sivo do črno obarvanje različnih tkiv, ki je posledica kopičenja pigmenta melanina. Pogosto jo lahko opazimo v trunkusu pulmonalisu in aorti, možganih, možganskih ovojnicah, nadledvičnih žlezah, maternici, ledvicah in ustni votlini. Melanozo moramo diferencialno diagnostično ločiti od melanoma.
- **Organi, polni krvi.** V organih, predvsem pljuči in jetrih, lahko najdemo večjo količino krvi, kot bi jo v njih pričakovali. Sprememba je posledica mrliške otrplosti, med katero se kri zaradi kontrakcije mišic iztisne v organe. Diferencialno diagnostično moramo to spremembo ločiti od polnokrvnosti, pri kateri pa vedno ugotovimo patološki ali patofiziološki vzrok.

Spremembe, ki jih najpogosteje najdemo pri pregledu organov

- **»Anestetična« vranica** je povečana, polnokrvna vranica, ki nastane zaradi delovanja sredstev za anestezijo, predvsem barbituratov v raztopinah za evtanazijo. Diferencialno diagnostično moramo anestetično vranico ločiti od polnokrvnosti, ki nastane zaradi akutnega zasuca vranice, od pasivne polnokrvnosti, hiperplazije in novotvorbe vranice.
- **Razširitev žolčnika**, ki je poln redkega žolča, najbolj pogosto vidimo pri živalih, ki nekaj časa niso zaužile hrane. Diferencialno diagnostično moramo izključiti obstrukcijo žolčevoda.
- **Polnokrvnost sluznice želodca** je pogosta fiziološka sprememba, ki se pojavlja po hranjenju. Diferencialno diagnostično jo moramo ločiti od gastritisa, pri katerem opazimo krvavitve, eksudat, erozije ali čire.
- **Duodenalna papila.** Na sluznici duodenuma lahko opazimo dve okrogli, različno veliki sluznični tvorbi – izvodili žolčevoda in pankreasovega voda. Izvodili pogosto napačno interpretiramo kot polipa ali novotvorbi.

- **Segmentalna polnokrvnost črevesa.** Pri raztelesbi pogosto opazimo segmente tankega črevesa, ki imajo polnokrveno sluznico ali vse plasti stene, rdeče obarvana je lahko tudi črevesna vsebina. To so področja s fiziološko polnokrvnostjo. Diferencialno diagnostično moramo tako spremembo ločiti od hemoragičnega enteritisa, pri katerem opazimo tudi edem, nekroze, ulceracije in izločanje fibrina.
- **Posmrtna črevesna invaginacija** nastane, ko se segment uviha v sosednji segment črevesa. Take invaginacije nastanejo v fazi agonije življenja ali tik po smrti, ko peristaltika še vedno deluje. Posmrtne črevesne invaginacije ločimo od intravitalnih invaginacij po tem, da pri njih ni polnokrvnosti, edema, krvavitve in izločanja fibrina.
- **Limfatično tkivo v črevesju** vidimo kot ovalne ali linearne agregate – Peyerjeve plošče v ileumu, distalnem delu jejunuma in včasih celo v duodenumu – ali kot okrogla, sivobela žarišča, premera nekaj mm, posejana po sluznici slepega črevesa in kolona.
- **Sluz v prebavilih.** Na sluznici želodca in tankega črevesa lahko najdemo gosto, rumenorjavo ali belo, motno vsebino, ki jo lahko zlahka odstranimo, sluznica pod njo pa je brez patoloških sprememb. Vsebinsko, ki je normalna, lahko neizkušeni ocenjevalec oceni kot kataralni eksudat.
- **Želodčna vsebina v sapniku in pljučih** je skoraj vedno posmrtna sprememba. Nastane zato, ker plini, nakopičeni v prebavilih, porinejo želodčno vsebino v požiralnik, ali zaradi manipulacije s truplom po smrti. Diferencialno diagnostično moramo to spremembo ločiti od aspiracije želodčne vsebine, ki pa vedno izzove reakcijo tkiva.
- **Pena v sapniku** je lahko tudi intravitalna sprememba, vendar zelo veliko penaste vsebine v sapniku in nosnicah dobimo tudi pri evtanaziranih živalih, ki pred poginom niso kazale znakov oteženega dihanja ali dihalne stiske.
- **Pljučni emfizem** najpogosteje nastane v fazi agonije, ko žival hlata po zraku. Pljučni emfizem je diagnostično pomemben le v primerih, ko imamo v anamnezi podatek, da je žival kazala znake oteženega dihanja.
- **Krvavitve pod epikardom, endokardom in v miokardu** nastanejo v agoniji kot posledica povečanega upora ožilja v okončinah in občasnih, močnih kontrakcij srčne mišice. Diferencialno diagnostično moramo tovrstne krvavitve ločiti od krvavitve pri sepsah in toksemijah.
- **Mesto, kjer je bila v srčno mišičnino injicirana raztopina za evtanazijo,** vidimo kot zeleno ali rumenorjavo, zelo vlažno področje. Kri v srčnih votlinah je v takih primerih zrnata, grudasta in rjava.

VNETJE

Vnetje (*inflammatio*) je kompleksna lokalna obrambna reakcija organizma na delovanje škodljivega dejavnika (nokse), pri čemer začnejo po tkivni poškodbi (alteraciji), ki zajema od degenerativnih sprememb do nekroze, iz polnokrvnih krvnih žil prehajati tekoče in celične sestavine krvi (eksudacija) ter brstijo celice oz. tkivo (proliferacija). Naloga vnetja je lokalna omejitev nastale škode, uničenje in odstranitev škodljivih dejavnikov, ki so povzročili poškodbo, in napraviti uničeno tkivo neškodljivo ter s tem omogočiti celjenje.

Vzroki vnetja

Vzročni dejavniki vnetja so vsi zunanji povzročitelji bolezni. Mednje spadajo:

1. fizikalni dejavniki: – mehansko-travmatska delovanja (udarci, vrezi itd.),
 - termični dejavniki (vročina in mraz),
 - aktinični dejavniki (sončni žarki, rtg žarki itd.),
2. kemični dejavniki (strupi, kemikalije itd.) in
3. infekcijsko-toksični dejavniki – mikroorganizmi (bakterije, virusi, glive, paraziti).

Vnetne celice

K vnetnim celicam prištevamo polimorfonuklearne granulocite (nevtrofilci, eozinofilci in bazofilci), mononuklearne fagocite, trombocite, limfocite, plazmatke in tkivne bazofilce. Prvi trije so sposobni

fagocitoze, ki predstavlja osrednjo vlogo pri vnetju, limfociti so ključne celice v imunskih dogajanjih, plazmatke izločajo protitelesa, tkivni bazofilci pa so v večini primerov začetne celice vnetja. Vnetne celice prehajajo iz krvi v akutni fazi eksudacije: najprej, že nekaj ur po vnetju, emigrirajo polimorfonuklearni granulociti, monociti se perivaskularno pojavijo v 24 do 48 urah, limfociti pa od 8. do 20. dneva.

Potek, izid in posledice vnetja

Vnetje traja, dokler niso vzrok, ki je vnetje povzročil, in posledice, ki so se med vnetjem razvile, odstranjeni. Trajanje je odvisno od:

- škodljivega dejavnika;
- začetnih in nadaljnjih poškodb tkiva;
- kakovosti vnetne reakcije;
- tkiva oz. organa, v katerem poteka, in
- celega organizma.

Vnetje je lahko zelo kratkotrajno – akutno – in poteka zgolj nekaj ur ali dni, lahko pa je dolgotrajno – kronično – in traja več tednov ali mesecev. Subakutno vnetje je po dolžini trajanja med akutnim in kroničnim.

Potek vnetja je odvisen od povzročitelja; če ga povzroči živi agens, se ta med vnetjem še naprej razmnožuje – škodljivi vpliv se tako povečuje, če pa ga povzroči neživi agens, je poškodba enkratna in kratkotrajna.

Akutno vnetje se lahko konča brez posledic, lahko preide v kronično vnetje, se konča z reparacijo ali s smrtjo organizma.

Glavne morfološke spremembe pri vnetju

Vneti organi in tkiva so običajno morfološko spremenjeni:

- barva je zaradi aktivne polnokrvnosti najpogosteje rdeča, zaradi nabiranja gnoja je lahko rumena ali zelena, zaradi brstenja veziva pa siva ali bela;
- velikost in teža sta zaradi kopičenja eksudata običajno povečani;
- oblika je običajno normalna, izjemoma je spremenjena, najpogosteje pri abscedirajočih in granulomskih vnetjih;
- konsistenca pa je zaradi nekroze in eksudata lahko mehkejša (izjema so pljuča) ali pa trša, če brsti vezivo ali se nalagajo kalcijeve soli.

Vrste vnetja

Vnetje lahko razlikujemo na različne načine. Glede na morfološke spremembe in osnovne vnetne komponente ločimo alteracijska, eksudacijska in proliferacijska vnetja.

1. Alteracijska vnetja so tista, ki imajo intenzivneje izraženo poškodbo tkiva. Mednje prištevamo:
 - nekrotično vnetje: prevladuje nekroza tkiva;
 - erozivno oz. ulcerozno vnetje: če se nekrotični proces odvija na prosti površini, npr. na sluznici ali koži, pogosto nastanejo razjede;
 - gangrenozno vnetje: nekrotično tkivo se okuži z gnilobnimi bakterijami, razvije se gangrena.
2. Pri eksudacijskih vnetjih prevladuje izcejanje tekočine iz krvnih žil z beljakovinami in krvnimi celicami – eksudat. Glede na kakovost eksudata in vrste celičnih elementov razlikujemo:
 - serozno vnetje: zanj je značilen serozni eksudat, ki vsebuje malo beljakovin in vnetnih celic in se pojavlja predvsem v telesnih votlinah;
 - kataralno vnetje: poteka kot blago vnetje na sluznicah, za katerega je značilno luščenje epitela, proizvodnja sluzi in eksudacija;
 - fibrinozno vnetje: nastane, če se z eksudacijo izceja veliko fibrinogena, ki se v tkivu spremeni v fibrin;

- gnojno vnetje: nastane, ko v eksudatu prevladujejo nevtrofilci, druge vnetne celice, tekočina in fibrin so v majhnih količinah;
- hemoragično vnetje: pri tem vnetju vsebuje eksudat veliko eritrocitov zaradi poškodovanih krvnih žil;
- gnilobno vnetje: je modifikacija gnojnega vnetja – v gnoj ali nekrotično tkivo se naselijo gnilobne bakterije;
- eozinofilno vnetje: pri tej vrsti vnetja je celični infiltrat sestavljen pretežno iz eozinofilcev;
- limfocitarno vnetje: zanj je značilen infiltrat iz skoraj izključno mononuklearnih celic (limfocitov, histiocitov in plazmatk).

Pogoste so tudi kombinirane oblike vnetja, npr. serofibrinozna, fibrinopurulentna vnetja itd.

3. Za proliferacijska vnetja je najbolj značilno brstenje celic oz. nastanek novega tkiva, alteracija in eksudacija sta slabo izraženi ali ju sploh ni. Proliferacijska vnetja so praviloma kronična. Razlikujemo granulomsko vnetje, pri katerem prevladujejo mononuklearne celice, predvsem makrofagi, ki oblikujejo granulome, na obodu katerih brstijo krvne žile in fibroblasti, in granulirajoče vnetje, kamor prištevamo:
 - intersticijsko vnetje: zajame oporno intersticijsko tkivo parenhimskih organov, pri čemer celično infiltracijo spremlja brstenje veziva;
 - organizirajoče vnetje: poteka zlasti na seroznih površinah pri odstranjevanju fibrinoznega eksudata;
 - hiperplastično vnetje: je vnetje, pri katerem se pojavlja prekomerna rast obstoječega tkiva;
 - polipozno vnetje: je posebna oblika hiperplastičnega vnetja na sluznicah, kjer nastanejo bradavičasti izrastki – polipi;
 - atrofično vnetje: nastane pri kroničnih kataralnih vnetjih, ko se odebelela sluznica zaradi močnega brstenja veziva kasneje stanjša, ker se vezivo skrči. V sluznici je manj žlezic.

LITERATURA

1. Del Cott R. Medicinski terminološki slovar. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1975.
2. Forbes SL, Dent BB, Stuart HS. The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 2005; 154: 35–43.
3. Forbes SL, Stuart BH, Dadour IR, Dent BB. A preliminary investigation of the stages of adipocere formation. *J Forensic Sci* 2004; 49: 566–74.
4. Jakšić BL, Sofrenović ĐR. Specijalna patološka morfologija za studente veterinarske medicine. Beograd: Naučna knjiga, 1972.
5. Kaliszan M, Hauser R, Kaliszan R, Wiczling P, Buczyński J, Penkowski M. Verification of the exponential model of body temperature decrease after death in pigs. *Exp Physiol* 2005; 90 (5): 727–38.
6. King JM, Dood DC, Roth L, Newson ME. The necropsy book. 3rd ed. Charles Louis Davis: D. V. M. Foundation, Gurnee, USA.
7. Kobayashi T, Takatori T, Nakajima M, et al. Onset of rigor mortis is earlier in red muscle than in white muscle. *Int J Legal Med* 2000; 113: 240–3.
8. Kobayashi M, Takemori S, Yamaguchi M. Differential rigor development in red and white muscle revealed by simultaneous measurement of tension and stiffness. *Forensic Sci Int* 2004; 140: 79–84.
9. Kostić A, Stanojević L. Medicinski leksikon. 3. izd. Beograd: Medicinska knjiga, 1970.
10. Sofrenović ĐR. Osnovi obdukcije i patomorfološke diagnostike. Beograd: Naučna knjiga, 1987.
11. Strafuss AC. Necropsy. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1987.
12. Šenk L. Patohistološki praktikum. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1992.
13. Šenk L. Splošna morfološka patologija. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1998.
14. Varetto L, Curto O. Long persistence of rigor mortis at constant low temperature. *Forensic Sci Int* 2005; 147: 31–4.
15. Yan F, McNally R, Kontanis EJ, Sadik OA. Preliminary quantitative investigation of postmortem adipocere formation. *J Forensic Sci* 2001; 46: 609–14.

36 RAVNANJE S TRUPLI POGINULIH/USMRČENIH ŽIVALI IN STRANSKIMI ŽIVALSKIMI PROIZVODI, KI NISO NAMENJENI PREHRANI LJUDI

Tomislav Paller

UVOD

Tako kot pri gojenju rejnih, proizvodnih, klavnih, hišnih in drugih živalih tudi pri gojenju poskusnih živali nastajajo živalski stranski proizvodi, ki niso namenjeni prehrani ljudi (ŽSP).

Po definiciji so ŽSP cela telesa ali deli živali, proizvodi živalskega izvora ali drugi proizvodi, pridobljeni iz živali, ki niso namenjeni prehrani ljudi, vključno z jajčnimi celicami, zarodki in živalskim semenom.

ZAKONODAJA

Pred vključitvijo Republike Slovenije v EU je področje živalskih odpadkov urejal »Pravilnik o ravnanju z živalskimi odpadki in minimalnih higiensko tehničnih pogojih, ki jih morajo pri tem izpolnjevati objekti in prevozna sredstva« (Ur. l. RS 117/02).

Zaradi nevarnosti širjenja transmisivnih spongiformnih encefalopatij (TSE) je bil leta 2003 sprejet »Pravilnik o preventivnih ukrepih v zvezi s transmisivnimi encefalopatijami« (Ur. l. RS 13/03, 37/03).

Leta 2004 je z vključitvijo Republike Slovenije v EU tudi pri nas stopila v veljavo »Uredba Evropskega parlamenta in Sveta EU št. 1774/2002 z dne 3. 10. 2002 o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi«. Glavni cilj Uredbe je bilo preprečevanje možnosti vstopa »odpadkov« živalskega izvora v prehransko verigo. S tem se je zmanjšalo tveganje za zdravje ljudi in živali, hkrati pa so se učinkovito zbiranje, ravnanje, predelava in neškodljivo odstranjevanje teh snovi uskladili z okoljsko zakonodajo.

Oktobra 2006 je začela veljati Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, in njenih izvedbenih predpisov Skupnosti in določitvi prekrškov za kršitve njenih določb. Ta uredba je določala izvajanje Uredbe (ES) št. 1774/2002 z vsemi njenimi spremembami.

Konec leta 2007 je bil sprejet »Pravilnik o zbiranju, prevozu, skladiščenju, ravnanju, uporabi in odstranjevanju živalskih trupel kot vrste živalskih stranskih proizvodov, ki niso namenjeni prehrani ljudi« (Ur. l. RS 122/2007). Določila Pravilnika so v skladu z Uredbo 1774/2002 in v posameznih elementih precej podrobno določajo zbiranje in prevoz trupel poginulih in usmrčenih živali.

Na podlagi ugotovitev številnih misij Urada Komisije za prehrano in veterinarstvo (FVO) v državah članicah v zadnjih letih sta Evropski parlament in Svet Evropske unije sprejela Uredbo (ES) 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 21. oktobra 2009 o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi. Ta je ohranila glavna načela zdaj že razveljavljene Uredbe 1774/2002, hkrati pa jasneje določila posamezna pravila, z namenom obvarovati krmno in prehransko verigo pred ŽSP, ki bi pomenili tveganje za zdravje ljudi in živali ter tveganje za okolje. Uredba 1069/2009 (Uredba) je v uporabi od 4. marca 2011 in poleg splošnih področnih pojmov določa obveznosti nosilcev dejavnosti ravnanja z ŽSP, kategorizacijo, pravila zbiranja, prevoza, odstranjevanja, uporabe in izjemne uporabe ŽSP. Za njeno izvajanje je bila sprejeta **Uredba Komisije (EU) št. 142/2011** z dne 25. februarja 2011 o izvajanju Uredbe (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter o izvajanju Direktive Sveta 97/78/ES glede nekaterih vzorcev in predmetov, ki so izvzeti iz veterinarskih pregledov na meji v skladu z navedeno direktivo.

Za izvajanje harmonizirane zakonodaje EU v Sloveniji je bila sprejeta Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi (Ur. l. RS št. 58/211). Ta določa pristojnosti za odobritve, registracije in izdajo dovoljenj, izvajanje uradnega nadzora ter kazenske določbe.

KATEGORIZACIJA ŽSP

Živalski stranski proizvodi so kategorizirani v tri kategorije, ki odražajo raven tveganja za javno zdravje in zdravje živali, in sicer na:

- snovi kategorije 1,
- snovi kategorije 2,
- snovi kategorije 3,

pri čemer so v kategorijo 1 uvrščene snovi z najvišjim tveganjem za zdravje ljudi in živali ter onesnaževanje okolja.

Snovi kategorije 1 zajemajo živalske stranske proizvode z naslednjim opisom ali katere koli snovi, ki vsebujejo tovrstne stranske proizvode:

- cela telesa ali vse dele telesa, vključno s kožami, s TSE okuženih ali s TSE domnevno okuženih živali ter živali, ki so bile ubite ob izvajanju ukrepov za izkoreninjenje TSE;
- snovi s specifičnim tveganjem (SRM), vključno s poginulimi sesalci in deli teh živali, ki vsebujejo te snovi;
- hišne živali, živali iz živalskih vrtov in cirkusov;
- živali, ki se uporabljajo v postopku ali postopkih iz člena 3 Direktive 2010/63/EU o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene, če pristojni organ sklene, da lahko take živali ali njihovi deli predstavljajo resno zdravstveno tveganje za ljudi ali druge živali;
- prostoživeče živali, če obstaja sum, da so okužene z boleznimi, nalezljivimi za ljudi ali živali;
- odpadki iz gostinske dejavnosti s prevoznih sredstev v mednarodnem prometu;
- proizvodi, pridobljeni iz živali, ki so prejemale snovi, prepovedane po Direktivi 96/22/ES, in proizvodi živalskega izvora, ki vsebujejo ostanke onesnaževalcev okolja ter druge snovi iz Direktive Sveta 96/23/ES, če navedeni ostanki presegajo dovoljene vrednosti;
- živalski stranski proizvodi, ki vsebujejo ostanke drugih snovi in kontaminante iz okolja, navedene v skupini B (3) Priloge I k Direktivi 96/23/ES, če takšni ostanki presegajo dovoljeno raven, določeno v zakonodaji Skupnosti ali, če ta ne obstaja, z nacionalno zakonodajo;
- mešanice snovi iz kategorije 1 s kakršnimi koli snovmi, namenjenimi predelavi v predelovalnem obratu kategorije 1.

Snovi kategorije 2 zajemajo živalske stranske proizvode z naslednjim opisom ali katere koli snovi, ki vsebujejo take stranske proizvode:

- gnoj in vsebina prebavnega trakta;
- mulji čistilnih naprav za odpadne vode iz obratov za predelavo snovi kategorije 2 in 3 ter klavnic;
- živalski stranski proizvodi, ki vsebujejo ostanke dovoljenih snovi ali kontaminantov, ki presegajo dovoljene ravni iz člena 15 (3) Direktive 96/23/ES;
- proizvodi živalskega izvora, ki so ocenjeni kot neprimerni za prehrano ljudi zaradi prisotnosti tujkov v navedenih proizvodih;
- proizvodi živalskega izvora, razen snovi kategorije 1, ki se uvažajo iz držav nečlanic in v toku inšpekcijskih pregledov, predvidenih v zakonodaji Skupnosti, ne izpolnjujejo veterinarskih zahtev za uvoz v Skupnost;
- živali in deli živali, razen tistih iz kategorije 1 in 3, ki poginejo drugače kot z zakolom za prehrano ljudi, vključno z živalmi, ki se pokončajo zaradi nadzora bolezni, plodove, zarodni material, ki je namenjen za vzrejne namene, in mrtva perutnina v jajčni lupini;
- mešanice snovi kategorije 2 s snovmi kategorije 3, vključno s katerimi koli snovmi, namenjenimi predelavi v predelovalnem obratu kategorije 2;
- živalski stranski proizvodi razen snovi kategorije 1 ali snovi kategorije 3.

Snovi kategorije 3 so z vidika poskusnih živali nepomembne, saj sem sodijo deli zdravih zaklanih živali, kože, rožene tvorbe živali, zaklanih v klavnicah, kri, nekdanja živila živalskega izvora, surovo mleko, ribe in ribji proizvodi, jajčne lupine, odpadki iz gostinskih dejavnosti, razen iz mednarodnega prometa.

ZBIRANJE IN PREVOZ ŽSP

Nosilci dejavnosti zbirajo, označijo in prevažajo ŽSP brez nepotrebnih zamud pod pogoji, ki preprečujejo tveganja v zvezi z javnim zdravjem in zdravjem živali. Nosilci dejavnosti zagotavljajo, da ŽSP spremlja komercialni dokument ali zdravstveno spričevalo, kadar to zahteva Uredba ali posebni ukrepi, izdani v zvezi s tem. Navedena dokumentacija mora vsebovati vsaj informacijo o izvoru ŽSP, kraju, kamor je proizvod namenjen, količini takšnega proizvoda in opisu samega proizvoda.

Ne glede na to, da je ŽSP potrebno odpeljati čim prej po njihovem nastanku, zakonodaja pri truplih laboratorijskih živali dopušča možnost zamrzovanja manjših količin tovrstnih ŽSP. V teh primerih je potrebno trupla poskusnih živali hraniti v za to posebej namenjenih zamrzovalnih napravah, ki so na zunanji strani označene z vodoravno rdečo črto širine 10 cm in se smejo uporabljati samo za ta namen. Zamrzovalne naprave morajo biti iz materiala, ki omogoča mokro čiščenje in razkuževanje, in zaklenjene s ključavnico. Načeloma naj bi bil odvoz tako shranjenih poskusnih živali izvršen vsakim sedem dni, možno pa je, da se pogostost odvoza prilagodi kapaciteti zamrzovalne naprave in količini trupel poskusnih živali.

Na splošno se ŽSP morajo zbirati in prevažati v zatesnjenih, pokritih, neprepustnih posodah, zabojnikih ali vozilih. Prevozna sredstva in zabojnike za večkratno uporabo ter vso opremo ali priprave za večkratno uporabo, ki prihajajo v stik z živalskimi stranskimi proizvodi, je treba po vsakokratni uporabi očistiti, oprati in razkužiti, ohranjati v čistem stanju in očistiti ter osušiti pred uporabo. Zabojniki za večkratno uporabo morajo biti namenjeni le prevozu posamezne vrste proizvoda v obsegu, potrebnem za preprečitev navzkrižne kontaminacije.

V skladu z nacionalno zakonodajo je potrebno ŽSP kategorije 1 in 2 oddati koncesionarju za izvajanje gospodarske javne službe v skladu z Uredbo o načinu, predmetu in pogojih izvajanja gospodarske javne službe ravnanja s stranskimi živalskimi proizvodi kategorije 1 in 2 (Ur. l. RS št. 134/2006, 1/2010).

KONČNA OBDELAVA ŽIVALSKIH STRANSKIH PROIZVODOV

Živalski stranski proizvodi kategorije 1 se lahko:

- odstranijo kot odpadke s sežigom ali s sosežigom (neposredno brez predelave ali po predelavi s sterilizacijo pri 133 °C najmanj 20 minut, pri tlaku najmanj 3 bare, pri čemer velikost delcev ne sme presegati 50 mm);
- uporabijo kot gorivo za sežig s predhodno predelavo ali brez nje.

Vmesno ravnanje s snovmi kategorije 1 ter njihovo skladiščenje smeta potekati le v obratih za ravnanje z ŽSP.

Snovi kategorije 2 se lahko:

- odstranijo kot odpadki s sežiganjem ali sosežiganjem;
- odstranijo na pooblaščenem odlagališču po predelavi s sterilizacijo;
- uporabijo za proizvodnjo organskih gnojil ali sredstev za izboljšanje tal;
- kompostirajo ali pretvorijo v bioplin po predhodni predelavi, v primeru gnoja prebavnega trakta in njegove vsebine pa po predhodni predelavi ali brez nje;
- porabijo na zemljiščih, kadar gre za gnoj ali vsebino prebavnega trakta, če pristojni organ meni, da ne pomenijo tveganja za širjenje katere koli nevarne prenosljive bolezni;
- uporabijo kot gorivo.

Vsi nosilci dejavnosti, ki delujejo na področju ŽSP (prevozniki, obrati ipd.), morajo biti registrirani oziroma odobreni v skladu z zakonodajo ŽSP.

LITERATURA

1. Pravilnik o zbiranju, prevozu, skladiščenju, ravnanju, uporabi in odstranjevanju živalskih trupel kot vrste živalskih stranskih proizvodov, ki niso namenjeni prehrani ljudi. Ur List RS 2007; 17 (122): 17934. (z dne 28. 12. 2007)
2. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16 (88): 2477. (z dne 18. 8. 2006)
3. Uredba (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 21. oktobra 2009 o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki so namenjeni prehrani ljudi, ter razveljavitvi Uredbe (ES) št. 1774/2002. Ur List EU 2009; L 300 (1069): 1–33. (z dne 14. 11. 2009)
5. Uredba Komisije (EU) št. 142/2011 z dne 25. februarja 2011 o izvajanju Uredbe (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter o izvajanju Direktive Sveta 97/78/ES glede nekaterih vzorcev in predmetov, ki so izvzeti iz veterinarskih pregledov na meji v skladu z navedeno direktivo. Ur list RS 2011; 21 (58): 8542. (z dne 22. 7. 2011)
6. Uredba o izvajanju Uredbe (ES) o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi. Ur List RS 2011; 11 (58): 8542. (z dne 22. 7. 2011)
7. Uredba o načinu, predmetu in pogojih izvajanja gospodarske javne službe ravnanja s stranskimi živalskimi proizvodi kategorije 1 in 2. Ur List RS 2006; 16 (134): 14845. (z dne 20. 12. 2006)

POVZETEK

Prevoz živali je stresna situacija, ki vpliva na dobro počutje živali pa tudi na veljavnost in uspešnost prihodnjih poskusov ali raziskav, ki vključujejo živali in njihovo potomstvo. To dejstvo zadeva vse vrste prevozov in vse vrste živali. Vedenjske in fiziološke reakcije na stresne dejavnike vplivajo na številne biološke funkcije in sisteme. Pri zmanjševanju vpliva transporta na živali je pomembno upoštevati njihove vrstne značilnosti in njihovo obnašanje ter potencialno najbolj stresne okoliščine za posamezne vrste živali, ki zato potrebujejo posebno pozornost. Področje komercialnih prevozov vseh vrst vretenčarjev ureja Uredba Sveta 1/2005. Uredba precej natančno določa pogoje prevoza ekonomskih vrst živali (govedo, ovce, koze, konji, perutnina, drugi sesalci), manj natančno pa ureja področje drugih vrst živali, predvsem je manj natančna glede tehničnih pogojev za prevoz drugih sesalcev, glodavcev, psov in mačk.

PREVOZ KOT STRESNI DEJAVNIK

Prevoz živali je stresna situacija, ki vpliva na dobro počutje živali pa tudi na veljavnost in uspešnost prihodnjih poskusov ali raziskav, ki vključujejo živali in njihovo potomstvo. To dejstvo zadeva vse vrste prevozov in vse vrste živali. Vedenjske in fiziološke reakcije na stresne dejavnike vplivajo na številne biološke funkcije in sisteme. Če je stres ekstremen ali dolgotrajen, se žival težje prilagaja okoliščinam, kar lahko vodi v trpljenje. Poleg prilagajanja so med prevozom živali lahko izpostavljene strahu, lakoti, žeji ali čutijo bolečine, odvisno od vrste in okoliščin, v katerih se prevažajo. Stres med prevozom poveča tveganje, da bodo živali zbolele. Ker je med prevozom težje ali nemogoče nadzirati dobro počutje živali in se ustrezno odzvati, če je le-ta ogrožena, je cilj za vse vpletene v prevoze zmanjšati dejavnike in okoliščine, ki povzročajo stres, z upoštevanjem vseh stresnih okoliščin, ki med prevozom vplivajo na živali (Preglednica 1).

Preglednica 1: Možni stresni dejavniki med prevozom.

Rokovanje z živalmi.

Ločitev od sovrstnikov, individualna namestitve v zabojnik, kletko.

Neznano okolje.

Nakladanje in razkladanje.

Gibanje vozila in vibracije med samo vožnjo, vključno s pospeševanji in zaviranjem.

Napor zaradi lovljenja ravnotežja (predvsem velike živali, ki stojijo).

Neznano okolje (zvoki, vonjave, vidni dražljaji) med samim prevozom in v uporabniški organizaciji (neznani ljudje, morda tudi nove socialne skupine).

Nihanja temperature in relativne zračne vlage.

Prostovoljno ali prisilno stradanje.

Motnje v dnevno-nočnem ritmu.

Za ocenjevanje stresa se uporabljajo številni kazalci, kot so raven kortizola, kortikosterona, glukokortikoidov, glukoze, mase nadledvične žleze, obnašanja, zaužite krme in vode ter izgube telesne teže. Običajno se za ocenjevanje stresa uporablja več različnih kazalcev hkrati, saj lahko uporaba le enega vodi v napačno sklepanje o dobrem počutju živali; na primer zvišan plazemski kortizol lahko pomeni stres ali pa je odgovor organizma na neko pozitivno spremembo v okolju.

Vsaka sprememba je za žival bolj ali manj stresna in prevoz je posebno močan dejavnik stresa, saj gre običajno za enkratni dogodek v življenju živali, na katerega se niso imele priložnosti privaditi. Pri zmanjševanju vpliva transporta na živali je pomembno upoštevati njihove vrstne značilnosti in njihovo

obnašanje, kar vključuje na primer znanje o tem, ali bodo oziroma bi morale živali med prevozom prejemati hrano in vodo, kako zaznavajo okolje, katere okoliščine so potencialno najbolj stresne za posamezne vrste živali in potrebujejo posebno pozornost. Te okoliščine so navedene v Preglednici 2.

Preglednica 2: Okoliščine, ki vplivajo na dobro počutje živali med prevozom in jih je pri prevozu potrebno upoštevati.

Zdravje in počutje živali, predvsem primernost živali za prevoz.
Oblika in vrsta materialov, iz katerih so izdelani zabojniki ali kletke. Zabojniki in kletke morajo omogočati enostavno polnjenje in praznjenje ter nadzor nad živalmi v njih med prevozom.
Število živali in prostor, ki je na voljo posamezni živali v kletkah ali zabojnikih.
Mikro okolje v zabojniku (temperatura, relativna zračna vlaga, ustrezna kvaliteta zraka).
Substrat (v primernih količinah, kakovosten) in/ali material za gradnjo gnezd.
Trajanje prevoza.
Število postankov in/ali menjave vozil, še posebej če je treba živali razložiti in ponovno naložiti.
Vozilo.
Izkušnost, odnos in usposobljenost osebja, ki rokuje z živalmi in opravlja prevoz.

PREDPISI IN PREDPISANE ZAHTEVE ZA PREVOZ

V Sloveniji je zaščita živali pred mučenjem ustavno določilo. Področje zaščite živali ureja **Zakon o zaščiti živali** (Ur. l. 98/99, 126/03, 14/07). Natančno opredeljuje pogoje za izvajanje poskusov na živalih, organizacije na področju vzreje, dobave poskusnih živali in izvajanja poskusov, vrste poskusnih živali, pogoje za pridobitev dovoljenja za izvajanje poskusov ter obveznosti organizacij. **Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS št. 88/2006)**, ki povzema Direktivo Sveta 86/609 z dne 24. novembra 1986 o približevanju zakonov in drugih predpisov držav članic o **varstvu** živali, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (UL L št. 358 z dne 18. 12. 1986, str. 1, z vsemi spremembami) in Direktivo Sveta 92/65/EGS z dne 13. julija 1992 o zahtevah zdravstvenega varstva živali za trgovino in za uvoz v Skupnost živali, semena, jajčnih celic in zarodkov, za katere ne veljajo zahteve zdravstvenega varstva živali, določene v posebnih pravilih Skupnosti iz Priloge A (I) k Direktivi 90/425/EGS (UL L št. 268 z dne 14. 9. 1992, str. 52, z vsemi spremembami), v členu navaja, da morajo vzrejne, dobaviteljske in uporabniške organizacije ustrezati pogojem glede prevoza živali iz predpisov, ki urejajo pogoje in način prevoza živali, in izpolnjevati pogoje iz Priloge 1 o nastanitvi in oskrbi živali, kjer so določeni nekateri dodatni pogoji za prevoz in ravnanje med prevozom.

Preglednica 3: Pakiranje živali in pogoji med prevozom.

Priloga 1 Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov (Ur. l. RS 88/2006)

Prevoz živali mora biti opravljen v skladu s predpisi, ki urejajo pogoje in načine prevoza živali.

Pri živalih, ki so pripravljene za poskuse, pri mladih ali starih živalih, živalih v zdravstveni negi ali živalih, ki imajo okvare genotipa, ki se klinično manifestirajo, je potrebna dodatna oskrba.

Zabojniki morajo biti oblikovani in izdelani tako, da se živali ne morejo poškodovati, da ne puščajo, da preprečujejo pobeg živali in poškodovanje oseb. V zabojnikih mora biti zadostna plast stelje. Če je potrebno, morajo biti zabojniki grajeni tako, da preprečujejo ali omejujejo vstop mikroorganizmov. Zabojniki morajo omogočati vizualno opazovanje živali brez ogrožanja mikrobiološkega statusa živali.

Ravnanje z živalmi ob prispetju na namembni kraj:

- ob prihodu morajo biti živali nemudoma sprejete, premeščene iz transportnih zabojnikov v čiste kletke ali druge nastanitvene prostore, pregledane, nakrmljene in napojene;
 - bolne ali poškodovane živali je treba nastaniti ločeno in pod nadzorom; nemudoma morajo prejeti veterinarsko pomoč; neozdravljive živali je treba po humani metodi nemudoma usmrtiti;
 - transportne zabojnike je treba neškodljivo uničiti, če ustrezna dekontaminacija ni izvedljiva.
-

V Evropski uniji področje zaščite živali med prevozom ureja **Uredba Sveta (ES) št. 1/2005** z dne 22. decembra 2004 o zaščiti živali med prevozom in postopki, povezanimi z njim, in o spremembi Direktiv 64/432/EGS in 93/119/ES ter Uredbe (ES) 1255/97 (objavljena v UL L 3, 5. 1. 2005, str. 1–44, v nadaljevanju Uredba (ES) št. 1/2005), ki se neposredno uporablja v vseh državah članicah. Uredba je dostopna na spletni strani <http://eur-lex.europa.eu/>.

Uredba se uporablja za prevoz živih vretenčarjev znotraj Skupnosti, vključno z namenskimi kontrolami, ki jih uslužbenci opravljajo na pošilkah, ki prispejo na carinsko območje Skupnosti ali ga zapuščajo (člen 1 (1)). Uredba se ne uporablja za prevoz živali, ki ni povezan z gospodarsko dejavnostjo.

Pri prevozu živih živali je potrebno zagotoviti, da je prevoz čim krajši, da so živali primerne za prevoz in se prevažajo s prevoznimi sredstvi (vključno z napravami za natovarjanje in raztovarjanje), ki so zasnovana in vzdrževana tako, da se preprečijo trpljenje in poškodbe živali. Osebe, ki ravna z živalmi, mora biti usposobljeno oziroma pristojno za ta namen. Živalim mora biti med prevozom zagotovljena dovolj velika talna površina in ustrezna višina na vozilu ter na voljo voda, krma in počitek v ustreznih časovnih razmikih, ki ustrezajo njihovi vrsti, velikosti in načrtovani vožnji (člen 3).

Skladno z določbami člena 6 o obveznostih prevoznika mora prevoznik:

- a) pridobiti dovoljenje za prevoz (kot določa člen 10 (1) oziroma člen 11 (1), če gre za vožnje, daljše od 8 ur);
- b) živali prevažati po tehničnih pravilih, ki jih določa Priloga I Uredbe, in
- c) zagotoviti, da ima voznik ali spremna oseba na cestnem vozilu, ki prevažata domače kopitarje ali domače govedo, ovce, koze, prašiče ali piščance, potrdilo o usposobljenosti v skladu s členom 17 (2) iste uredbe;
- d) za dolge vožnje, daljše od 8 ur, uporabljati le odobrena vozila, ki morajo ustrezati zahtevnejšim tehničnim standardom.

Uredba določa, da se za prevoz drugih sesalcev in ptic uporabljajo določila členov 10 in 11 Uredbe (ES) št. 1/2005 in pa določila Priloge I, poglavja II, točke 1, poglavja 3 in točke 2.7, ki govorijo o tehničnih pogojih za prevoz omenjenih vrst živali.

Za prevoz drugih sesalcev in ptic mora prevoznik pridobiti dovoljenje za prevoz, ki ga na podlagi vloge izda pristojni območni urad VURS. Prevoznik mora imeti med prevozom (skladno s členom 4 Uredbe) pri sebi dokumentacijo, v kateri so navedeni poreklo in lastništvo živali, kraj, datum in čas odhoda, namembni kraj in predvideno trajanje vožnje. Poleg navedenih dokumentov mora prostoživeče živali in živali, ki niso domače rejne živali, spremljati obvestilo, da so živali plašne ali nevarne, ter pisno navodilo glede hranjenja, napajanja in zahtevane posebne nege (Priloga I, poglavje II, točka 1.3). Prevoznik, ki prevažata te živali, mora zagotoviti, da se med prevozom živalim nudijo voda, krma in možnost, da se spočijejo, kot je primerno za njihovo vrsto in starost, v primernih časovnih presledkih in kot je navedeno v poglavju V. Če ni navedeno drugače, se sesalci in ptiči nakrmijo vsaj vsakih 24 ur in napojijo vsaj vsakih 12 ur. Voda in krma sta kakovostni in se živalim dajeta tako, da se čim bolj zmanjša možnost okužbe. Treba je ustrezno upoštevati potrebo živali, da se navadijo na način krmljenja in napajanja (Priloga I, poglavje III, točka 2.7).

V Prilogi II so v točki 2 navedene tudi dodatne določbe za cestni ali železniški prevoz. Vsako vozilo za prevoz po cesti ali železnici mora imeti jasno in vidno oznako, da so na njem žive živali, razen če se živali prevažajo v zabojnikih. V tem zadnjem primeru mora biti oznaka »žive živali« na zabojniku. Dodatne določbe za prevoz po zraku, navedene v točki 4 Priloge II, pa zahtevajo prevoz živali v zabojnikih, ki so v skladu z uredbami Mednarodnega združenja letalskih prevoznikov (IATA) in v razmerah, ki omogočajo vzdrževanje ustrezne ravni kakovosti zraka, temperature in pritiska med celotno vožnjo glede na vrsto živali.

Pri uporabi Uredbe Sveta (ES) 1/2005 pa je treba upoštevati tudi **Resolucijo o nakupu in prevozu laboratorijskih živali**, ki je bila sprejeta maja 1997 na večstranskem posvetovanju pogodbenic Konvencije Sveta Evrope (ETS št. 123), in Priporočilo komisije z dne 18. junija 2007 **o smernicah za bivališča in oskrbo živali**, ki se uporabljajo za poskusne in druge znanstvene namene (objavljeno v UL L št. 197 z dne 30. 7. 2007, stran 1–89, v nadaljevanju Priporočila komisije C(2007) 2525).

PREVOZ LABORATORIJSKIH ŽIVALI: GLODAVCI, PSI IN MAČKE, PRIMATI

Glodavci

Kljub dejstvu, da se laboratorijske glodavce prevažata v velikem številu, večinoma iz vzrejenih organizacij v uporabniške organizacije, kjer se bodo te živali uporabljale za poskuse, je zelo malo raziskav, ki bi proučevale vpliv prevoza na dobrobit glodavcev, predvsem vrst, naštetih v preglednici 4. Informacije, ki so na voljo, so v veliki večini različna vodila, ki so, bolj kot rezultati znanstvenih raziskav, plod več desetletnih praktičnih izkušenj.

Preglednica 4: Vrste glodavcev, ki se najpogosteje uporabljajo v poskusih.

Vrsta, latinsko ime
<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Mus musculus</i>
<i>Cavia porcellus</i>
<i>Mesocricetus auratus</i>
<i>Meriones unguiculatus</i>

Naštete vrste so majhni ali zelo majhni sesalci, zato jih je mogoče prevažati v kletkah ali v drugih vrstah zabojnikov. Kletke oziroma zabojniki so običajno oblikovani tako, da živali ne morejo pobegniti, opremljeni pa so tudi z odprtini (vrati) za pregled in prezračevanje. Materiali, iz katerih so kletke, naj bi bili nestrupeni in taki, da jih živali ne morejo zaužiti, poleg tega naj bi bili pralni. Nekatere vrste zabojnikov je mogoče tudi sterilizirati (v avtoklavu) in so namenjeni večkratni uporabi, nekateri so namenjeni enkratni uporabi. Z izjemo hrčkov in samcev miši nekaterih sevov našete vrste običajno živijo v socialnih skupinah, zato se običajno prevažajo v parih ali skupinah. Posebna previdnost je potrebna pri nameščanju živali v kletke ali zabojnike oziroma pri jemanju živali iz njih. Če je mogoče kletko ločiti s pomočjo razdelilnikov, se v eni kletki lahko prevažata več skupin hkrati. Voda in krma sta tudi med prevozom običajno stalno na voljo, saj je stalen dostop do krme pri teh živalih pomemben za vzdrževanje telesne temperature. Hrana je v obliki peletov, včasih tudi kot sveža zelenjava in sadje (jabolka, korenje ipd.), pod pogojem, da so živali vajene tovrstne hrane. Izogibati se je potrebno hrani, ki bi lahko začela gniti v sorazmerno kratkem času. Običajno je na voljo tudi voda, včasih v koloidni obliki.

Glodavci potrebujejo dovolj prostora, da lahko zavzamejo udoben položaj za počitek, za lastno nego, da se dvignejo na zadnje noge in da se lahko na splošno premikajo. Priporočene¹ talne površine temeljijo na praktičnih izkušnjah. Talne površine, ki morajo biti na voljo posamezni podgani, na primer glede na velikost živali ter opremljenost kletk oziroma zabojnikov s filtri in sistemi za nadzor temperature, se gibljejo od 60 cm²/žival, težko 50 g, pa do 600 cm²/žival, težko nad 250 g. Če zabojnik ni opremljen s sistemom aktivne kontrole temperature oziroma kletke in zabojniki nimajo filtrov (le-ti omejujejo izmenjavo zraka), mora biti na voljo večja talna površina na žival. Kletka naj bi bila visoka 15 cm ali več.

Smrtnost med prevozom se pri glodavcih pojavlja tudi zaradi agresivnosti in borb med neznanimi živalmi, ki so bile združene pred ali med prevozom. Ker je dobro počutje ogroženo, če žival skoti med prevozom, se je potrebno izogibati prevozom živali v zadnji fazi brejosti. Uredba 1/2005 določa, da živali v zadnji desetine brejosti niso primerne za prevoz.

Posebna previdnost je potrebna pri genetsko spremenjenih živalih, če imajo drugačne potrebe (na primer gole miši).

Psi in mačke

Za pse in mačke je značilna zelo velika variabilnost med posameznimi osebki, tudi pri odzivih na prevoz. Pri tem imata poleg genetskih dejavnikov precejšnjo vlogo tudi ustrezna socializacija mladičev in pogoji, v katerih so živali vzrejene. Zelo uspešna metoda za zmanjšanje stresa pri prevozu je privajanje mačjih in pasjih mladičev na transportne kletke v času socializacije. To je t. i. občutljivo

¹ Laboratory Animal Science Association (LASA) Guidelines

obdobje, v katerem so določeni odgovori, odzivi, preference enostavneje pridobljeni kot v kasnejših obdobjih. To obdobje traja od 3. do 12. tedna starosti in je pomembno za primarno socializacijo. V tem obdobju se pri mladičkih psov vzpostavi povezava s človekom in drugimi živalmi, s katerimi pridejo v tem obdobju v stik. Pri premagovanju stresa zaradi prevoza je zgodnji pozitivni stik pasjega mladiča s človekom zelo pomemben.

Psi in mačke se prevažajo v kletkah, za katere na splošno velja, da naj bi bile dovolj velike, da lahko pes ali mačka v njih normalno stoji, se obrne in leži. Pri tem je potrebno upoštevati, da psi pri ležanju lahko zavzamejo štiri različne pozicije. Pri stranski poziciji z iztegnjenimi nogami tako potrebujejo prostor, ki ustreza dolžini, pomnoženi z višino od tal do višine ramen. Od višine kletke sta odvisna kakovost zraka v kletki in prezračevanje.

Pri prevozu živali v skupinah je zaradi pojava agresij potrebno paziti, da se neznanih živali ne meša med seboj. Prav tako se preusmerjeno agresivno vedenje lahko pojavi tudi v skupini živali, ki se med seboj poznajo. Taka agresivnost je običajno posledica odziva na strah, ko se žival ne more umakniti ogrožajoči okoliščini. Problem pri transportu psov in mačk je lahko tudi termoregulacija, zato se priporoča uporaba dobro izoliranih transportnih kletk.

Voda mora biti psom in mačkam na voljo vsakih 12 ur. Splošno sprejeto je, da je 24-urni interval za krmljenje primeren, saj psi sorazmerno dobro prenašajo stradanje. Vendar je pri tem potrebno upoštevati velikost, starost, pasmo in ravnanje z živaljo pred transportom ter ustrezno prilagoditi intervale. Zaradi preprečevanja slabosti in bljuvanja med prevozom se zadnji lažji obrok priporoča 4 ure pred potovanjem.

Primati

Prevoz (še posebej daljši) pri primatih izzove močan stres. Začne se lahko že nekaj tednov pred dejansko vožnjo z izolacijo živali, ki se bodo prevažale, zaradi določitve zdravstvenega statusa in morebitne karantene. Na koncu tega obdobja se namestijo v običajno zelo majhne kletke, v katerih v ekstremnih primerih preživijo do 50 ur. Stresne okoliščine v času prevoza za primare so pomanjkanje hrane in vode, izpostavljenost ekstremnim temperaturam in nihanjem temperatur, prepihu, hrupu. V zadnjih nekaj letih je bilo opravljenih nekaj raziskav o vplivu transporta na primare in rezultati kažejo na to, da prevoz negativno vpliva na dobro počutje primatov. Diareja, ki je eden od pogostih kliničnih znakov med karanteno po prevozu (uvozu), bi lahko bila delno povezana tudi s stresom zaradi prevoza. Zato naj bi bili primati (razen človeka), ki se uporabljajo za znanstvene raziskave, kadar je to izvedljivo, vzgojeni v ujetništvu na istem mestu, na katerem se izvajajo poskusi. Pri živalih, vzgojenih v ujetništvu, so znani njihova starost, poreklo, zdravstveno stanje, razen tega so bile vzgojene v skladu s standardnimi postopki vzreje. Če se prevažajo, jih je treba prevažati v združljivih parih, kadar je to mogoče.

LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16 (88): 9477.
2. Uredba Sveta (ES) št. 1/2005 z dne 22. decembra 2004 o zaščiti živali med prevozom in postopki, povezanimi z njim, in o spremembi Direktiv 64/432/EGS in 93/119/ES ter Uredbe
3. EFSA (European Food Safety Authority). The welfare of animals during transport. Scientific report of the scientific panel on animal health and welfare on a request from the Commission related to the welfare of animals during transport. Parma: EFSA, 2002.
4. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to the welfare of animals during transport. EFSA J 2004; (44): 1–36. (No. EFSA-Q-2003-094)
5. LASA transport working group. Guidance on the transport of laboratory animals: report of the Transport working group established by the Laboratory Animal Science Association (LASA). Lab Anim 2005; 39: 1–39.

Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS, št. 88/2006), Pravilnik o strokovnih, kadrovskih in tehničnih pogojih za opravljanje poskusov na živalih (Ur. l. RS, št. 36/2004) in Pravilnik o načinih usmrtnitve poskusnih živali (Ur. l. RS, št. 140/2006) predpisujejo evidence in vso ostalo dokumentacijo za uporabniške, dobaviteljske in vzrejne organizacije. Zaradi sprejemanja nove zakonodaje s področja zaščite živali bodo v sklopu veljavne zakonodaje predstavljeni tudi predlogi oz. novosti, ki se tičejo nekaterih evidenc.

Vzrejne organizacije morajo evidence hraniti najmanj deset let, dobaviteljske in uporabniške organizacije pa najmanj pet let in jih na zahtevo predložiti VURS.

Evidence vključujejo podatke, ki so zapisani v Pravilnikih. Vodne so na obrazcih, ki jih predpisuje posamezna uporabniška organizacija. V nadaljevanju so prikazani vzorci priprave evidenc s podatki, ki so predpisani s Pravilniki. Nekateri so v uporabi na Veterinarski fakulteti v Ljubljani. Evidence so lahko vodene v papirnati ali elektronski obliki, v večini primerov, še posebej za evidence, ki se vodijo v laboratoriju (npr. evidenca o temperaturi in vlagi v prostoru), je primernejša papirnata oblika, ki jo imamo na vidnem mestu v laboratoriju in jo sproti izpolnjujemo.

Evidence, ki jih je potrebno voditi pri delu s poskusnimi živalmi in se razlikujejo glede na vrsto organizacije (Preglednica 1).

Preglednica 1: Vrste evidenc glede na vrsto organizacije.

Vrsta evidence	Vzrejne organizacije	Dobaviteljske organizacije	Uporabniške organizacije
Evidenca o vzreji živali	√		
Evidenca o nabavi živali	√	√	√
Evidenca o prodaji živali	√	√	
Evidenca o rezultatih krvnih preiskav in drugih diagnostičnih postopkov	√		
Evidenca o primerih bolezni in uporabljenem zdravljenju	√		
Evidenca o patomorfoloških rezultatih pregledov živali	√		
Evidenca o opažanju v času izolacije ali karantene živali	√	√	√
Evidenčno označevanje kletk	√	√	√
Pisno soglasje lastnika*			√
Evidenca o temperaturi in vlagi v prostoru	√	√	√
Evidenca čiščenja	√	√	√
Evidenca razkuževanja	√	√	√
Zapisniki o izvajanju poskusov			√
Poročilo o končanem poskusu			√
Skupno letno poročilo o izvedenih poskusih			√
Poročilo o usmrtnitvah živali			√
Evidenca o shranjevanju živalskih trupel			√
Evidenca o oddaji živalskih trupel			√

* Če žival ne izhaja iz registrirane reje (klinični pacienti – obolele živali: psi, mačke ter rejne živali)

Vzrejne in dobaviteljske organizacije

Voditi morajo naslednje evidence:

- evidenco o vzreji živali (Preglednica 2),
- evidenco o nabavi živali (Preglednica 3),
- evidenco o prodaji živali (Preglednica 4),
- evidenco o rezultatih krvnih preiskav in drugih diagnostičnih postopkov (Preglednica 5),
- evidenco o primerih bolezni in uporabljenem zdravljenju (Preglednica 6),
- evidenco o patomorfoloških rezultatih pregledov živali (Preglednica 7),
- evidenco o opažanju v času izolacije ali karantene živali (Preglednica 8).

Vzreja živali

Vzreja živali se lahko izvaja na enotah, ki jih odobri VURS. Odgovorna oseba mora pripraviti in o tem voditi naslednje evidence:

- program vzreje (Preglednica 9),
- program čiščenja (Preglednica 10),
- program razkuževanja (Preglednica a 11),
- program zdravstvenega varstva živali za naslednje leto in ga do 30. septembra tekočega leta predložiti VURS v potrditev,
- program zdravstvenih pregledov zaposlenih, ki so v stiku z živalmi.

Preglednica 2: Primer evidence o vzreji živali.

Priloga 1 k V171, verzija 2

11

EVIDENCA O VZREJI ŽIVALI

ŠTEVILKA
VZREJNE KLETKE

PODATKI O STARŠIH

vrsta živali	živalski sev	generacija	spol	število	datum rojstva	datum prijema	pogoji ali ugotovitve

PODATKI O LEGLU

[illegible]

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Preglednica 3: Primer evidence o nabavi živali.

1/1

[illegible]

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o nabavi živali vsebovala še podatke o kategoriji živali (K): razplod = razplodne živali, poskus = živali, ki bodo uporabljene v poskusih, tkiva = živali, ki bodo usmrčene za delo na tkivih ter drugo; podatek o številki potrdila (potrdilo je priloga), podatek o trajanju karantene/aklimatizacije in opažanjih ter podpis osebe, ki je živali sprejela. Oznaka živali naj bi vsebovala podatke ID živali in kletke, poleg vrste živali pa bi bilo potrebno dodati še podatke o liniji in pasmi živali.

Preglednica 4: Primer evidence o prodaji živali.

Priloga 3 k V 171, verzija 2

11

EVIDENCA O PRODAJI ŽIVALI

[illegible]

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

V predlogu nove zakonodaje naj bi se evidenca o prodaji živali imenovala evidenca o oddaji živali in bi vsebovala še podatke o kategoriji živali (K), številko izdanega potrdila o izvoru živali ali tkiv, ki ga izda organizacija ob oddaji živali/tkiv (če obstaja) ter podpis osebe, ki je živali/tkiva oddala ter osebe, ki je živali/tkiva prevzela.

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o rezultatih preiskav nadomestila podatek o datumu odvzema vzorca z datumom pošiljanja vzorca, k podatku o vrsti živali bi bilo potrebno dodati še podatek o liniji in pasmi živali, ID živali in kletke, podatke o spolu in številu živali, datumu preiskave ter številki izvida (izvid je priloga).

Pod vrsto diagnostičnega postopka oz. preiskave se vpiše vrsta preiskave npr. mikrobiološke, parazitološke, patomorfološke, patohistološke, serološke ali navede druga vrsta preiskave.

Preglednica 5: Primer evidence o rezultatih krvnih preiskav in drugih diagnostičnih postopkov.

Priloga 4 k V 171, verzija 2

1/1

EVIDENCA O REZULTATIH KRVNIH PREISKAV IN DRUGIH DIAGNOSTIČNIH POSTOPKOV

oznaka	vrsta živali	datum odvzema vzorca	vrsta vzorca	vrsta diagnostičnega postopka	rezultat

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Preglednica 6: Primer evidence o primerih bolezni in uporabljenem zdravljenju.

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o primerih bolezni in uporabljenem zdravljenju vsebovala še podatke o datumu pojava bolezni, ID živali/kletke, spolu in številu živali, vrsti preiskave (če obstaja) ter številki izvida (izvid je v prilogi). Podatek o predpisanem zdravljenju bi se nadomestil s podatkom o usodi živali.

EVIDENCA O PRIMERIH BOLEZNI IN UPORABLJENEM ZDRAVLJENJU

oznaka	vrsta živali	datum postavitve diagnoze	diagnoza	PREDPISANO ZDRAVLJENJE

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Preglednica 7: Primer evidence o patomorfoloških rezultatih pregledov živali, ki so poginile v organizaciji, vključno z mrtvorojenimi živalmi.

EVIDENCA O PATOMORFOLOŠKIH PREGLEDIH POGINJENIH ALI MRTVOROJENIH ŽIVALI

oznaka	vrsta živali	datum preiskave	vzrok	PATOMORFOLOŠKI IZVID

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Preglednica 8: Primer evidence v času izolacije ali karantene živali.

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Živali, ki predhodno niso bile označene, morejo biti označene takoj po namestitvi. Živali se označujejo tako, kot je predpisano v Pravilniku o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (13. člen in Priloga 1). Mali laboratorijski glodavci, ki so v kletkah nameščeni v skupinah, se označujejo s skupno oznako na kletki. Za označevanje kletk se uporabljajo obrazci za posamezne živali in gnezdo (Preglednici 9 in 10).

Priloga 15 k V171, oznaka 1 1/3
Oznaka klasa – poskus

Številka/oznaka: _____

Vrsta: _____ Sev: _____ Število: _____

Genotip: _____ Datum rojstva: _____

Mati: _____ Oče: _____

Raziskovalec: _____

Čas nastanitve: _____

Namen nastanitve: _____

Drugo: _____

[illegible]



Slika 1 in 2: Kletke z miškami in primer njihovega označevanja.

Po trenutni zakonodaji oboje živali, tj. klinični pacienti, spadajo pod poskusne živali. Te živali ne izvirajo iz registrirane reje ali dobaviteljske ustanove. V tem primeru potrebujemo:

- pisno soglasje lastnika (Slika 3),
- lastnik živali mora biti seznanjen s postopki poskusa in dati pisno soglasje.

IZJAVA O SODELOVANJU V RAZISKAVI

Podpisani _____, lastnik
 _____, pasme _____, starost _____
 oznaka _____ sem seznanjen s
 postopkom, ki bo opravljen pri moji živali in z njim soglašam ter dovoljujem, da se
 pridobljene podatke o zdravstvenem stanju moje živali uporabi v raziskavi –
 _____.

Kraj in datum:

Podpis lastnika:

Slika 3. Primer pisnega soglasja lastnika.

Evidence o nastanitvi živali

Živali morajo biti nastanjene vrsti primerno. Pri tem se upoštevajo določila Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Za vsakodnevno oskrbo je zadolžen odgovorni skrbnik. Pomembno je imeti tudi namestnika skrbnika živali, ki skrbi zanje ob morebitni odsotnosti skrbnika.

Okolje je potrebno nadzorovati ter redno čistiti in razkuževati po programu.

Ob tem vodimo:

- evidenco o temperaturi in vlagi v prostoru (Preglednica 11),
- evidenco čiščenja (Preglednica 12),
- evidenco razkuževanja (Preglednica 13).

Preglednica 11: Primer evidence o temperaturi in vlagi v prostoru.

1/1

EVIDENCA O TEMPERATURI IN VLAGI V PROSTORU

Merilno mesto: _____

Leto in mesec: _____

Dan	Ura	Temperatura v °C	Relativna vlaga v %	Fodpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

Pregledal/-a:

(datum in podpis)

Evidenca se vodili ločeno za vsak prostor posebej ali več prostorov z nastanjenimi živalmi.

Preglednica 12: Primer evidence čiščenja.

1/1

EVIDENCA ČIŠČENJA

Mesec: _____

Odgovorna strokovna oseba na enoti VF:

[illegible]

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Preglednica 13: Primer evidence razkuževanja.

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Prav tako velja za čiščenje. Iz evidenc mora biti razvidno, ali je zagotovljeno redno in učinkovito čiščenje prostorov in opreme, ali se vodi primerna evidenca in ali obstaja program čiščenja prostorov in opreme ipd.

Uporabniške organizacije

- evidenco o nabavi živali (Preglednica 3);
- zapisnike o izvajanju poskusov (Preglednica 14);
- vodja poskusa mora po končanem poskusu pripraviti poročilo (Preglednica 15);
- skupno letno poročilo o izvedenih poskusih na obrazcu iz Priloge 5 Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih, ki ga pripravi strokovnjak za zaščito živali in ga do konca meseca februarja posreduje na VURS;
- strokovnjak za zaščito živali je poleg zgoraj omenjenega poročila vsako leto dolžan oddati še letno poročilo o usmrčitvah živali (člen 13 Pravilnika o načinu usmrčitve o poskusnih živalih) (Preglednica 16).

Preglednica 14: Primer zapisnika o izvajanju poskusov.

Priloga 14 k V 171, verzija 1

1/1

ZAPISNIK POSKUSA

1.	Enota VF	
2.	Naslov in namen poskusa	
3.	Številka dovoljenja VURS in datum poteka dovoljenja	
4.	Vodja poskusa	
5.	Odgovorna strokovna oseba	
6.	Oseba za obveščanje	
7.	Odgovorni skrbnik	
8.	Vrsta živali in število (oznake)	
9.	Opis poskusa	datum postopek
10.	Usoda živali	
11.	Opombe	

Pripravlil/-a:

Pregledal/a: _____
(datum in podpis)

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o izvajanju poskusa vsebovala največ novosti. Vsebovala bi naslednje podatke o: vodji projekta, številki dovoljenja, naslovu projekta, nazivu poskusa, datumu pričetka poskusa, ID poskusa (če obstaja), podatke o živalih (ID živali/kletke, vrsti , liniji in pasmi živali, spolu in številu živali), usodi živali (evtanazija, pogin, izpuščene/ vrnjene živali ter datum), datum zaključka poskusa in podpis izvajalcev.

Preglednica 15: Primer končnega poročila o poskusu na živalih.

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

Enota:

Končno poročilo o poskusu na živalih

Št. dovoljenja:
Delovno ime poskusa:

Vodja poskusa:
Izvajalci:

Datum ali časovno obdobje poskusa:

Uporabljene živali

Vrsta	Pasma/sev	Spol	Druge lastnosti	Število živali	Izvor	Končna usoda živali

Kratek opis poskusa (namen poskusa, morebitna uporaba anestetike, opis izida poskusa - pogin, žrtvovanje, uporaba živali za nadaljnji ali drug poskus):

Najpomembnejši rezultati/ugotovitve:

Bodoči plani (načrtovana nadaljevanja, ponovitve ali razširitev poskusa):

Žig organizacije in podpis vodje poskusa

Preglednica 16: Primer poročila o usmrtitvah poskusnih živali, živali za uporabo tkiv, organov v raziskovalne in izobraževalne namene ter odvečnih laboratorijskih živalih.

Vrsta	Število	Izvor	Razlog usmrtitve	Skupaj
Miš	XX	Center za genomiko živali, VF (domača registrirana reja)	Druge bolezni ljudi	
Miš	XX	Center za genomiko živali, VF (domača registrirana reja)	Diagnostika bolezni	
Miš	XX	Center za genomiko živali, VF (domača registrirana reja)	Izločitev iz reje	Miši: XX
Podgana	XX	Medicinski eksperimentalni center MF	Anabolno delovanje hormonov	
Podgana	XX	Medicinski eksperimentalni center MF	Pedagoški proces	Podgane: XX

Ravnanje s kadavri

Vzrejne in uporabniške organizacije vodijo dodatne evidence o:

- usmrtitvi živali (Preglednica 17);
- shranjevanju živalskih trupel (Preglednica 18);
- oddaji živalskih trupel s podatki v skladu s predpisi, ki urejajo živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi (Preglednica 19).

Odstranjevanje trupel

Odstranjevanje trupel poskusnih živali mora biti izvedeno v skladu s predpisi, ki urejajo živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi.

Preglednica 17: Primer evidence o usmrtitvi živali.

Vrsta živali	Število živali	Starost živali	Oznaka in število živali	Datum usmrtitve	Način usmrtitve	Razlog za usmrtitev (namen uporabe, številka dovoljenja)	Način odstranitve	Podpis osebe, ki je izvedla usmrtitev v živali

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o usmrtitvi živali še podatke o ID živali/kletke ter spolu živali. Pod rubriko razlog usmrtitve bi vpisali naslednje podatke: številka odločbe pri delu na živalskih tkivih, številka dovoljenja za projekt ali interna ID raziskave/poskusa, odvečne za odvečne živali, senilni razplod in drugo (navesti: npr. preiskave, bolne živali, ...).

Preglednica 18: Primer evidence o shranjevanju živalskih trupel.

1/1

EVIDENCA O SHRANJEVANJU ŽIVALSKIH TRUPEL

[illegible]

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o shranjevanju živalskih trupel vsebovala še podatke o razlogu smrti (pogin, usmrnitev – številka odločbe pri delu na živalskih tkivih; številka dovoljenja za projekt ali interna ID raziskave/poskusa), odvečne za odvečne živali; senilni razplod; drugo (navesti: npr. preiskave, bolne živali ...).

Ločeno pa bi obstajala še evidenca o poginu živali, s podobnimi podatki, samo da bi vsebovala še podatke o kategoriji (K) živali.

Preglednica 19. Primer preglednice o oddaji živalskih trupel.

1/1

EVIDENCA O ODDAJI ŽIVALSKIH TRUPEL

[illegible]

Pregledal/-a: _____
(datum in podpis)

Pri podatku o količini je potrebno napisati težo v kg.

V predlogu nove zakonodaje naj bi evidenca o oddaji živalskih trupel vsebovala še podpis osebe, ki je trupla/odpadke oddala, številko potrdila, ki ga izda pri prevzemu živalskih trupel prejemnik (potrdilo je priloga) ter naziv pooblaščenice organizacije, ki je trupla prevzela. Vodja poskusa je dolžan skrbeti za vse potrebne evidence, pri tem mu lahko pomaga strokovnjak za zaščito živali. Ob letnih pregledih VURS je potrebno pokazati vso potrebno dokumentacijo in evidence, ki se morajo ujemati in biti sledljive.

LITERATURA

1. Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih. Ur List RS 2006; 16(88).
2. Pravilnik o strokovnih, kadrovskih in tehničnih pogojih za opravljanje poskusov na živalih. Ur List RS 2004; 14(36).
3. Pravilnik o načinih usmrtnitve poskusnih živali. Ur List RS 2006; 16(140): 16316.

Valentina Kubale, Dragica Ornik

Čas trajanja: 1 ura

Navodila:

- razdelite se v skupine po 3 – 4, tako, da se oblikujejo 4 skupine
- vsaka skupina rešuje vprašanja, ki so obravnavana v določenem delu zakonodaje glede zaščite živali
- o vprašanjih skupine razpravljajte 10 minut
- nato o temah vsake sekcije govorimo 10 minut

Pomoč:

- v oklepajih je navedena pomoč, kjer najdemo tematiko vprašanja
- če tematike ne pokriva Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih, potem ga pokriva Zakon o zaščiti živali. Odgovore lahko najdete tudi v Prilogah pravilnika

Literatura:

- Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (UL RS, št. 88/2006)
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (UL RS, št. 81/2009)
- Zakon o zaščiti živali (UL RS, št. 43/2007)

Skupina 1: Zakonske zahteve glede usposobljenosti ljudi za delo s poskusnimi živalmi

1. Znanstvenik, dr. Novak je opravil tečaj za vodjo poskusa in je pridobil licenco od Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS). Pridobil je tudi dovoljenje za poskus, pri katerem lahko premakne arterije pri prašičih iz zadnje okončine v srce. Tehnik, ki z dr. Novakom dela že več let in po mnenju dr. Novaka ne potrebuje nobenega tečaja za delo z laboratorijskimi živalmi, je pri izvajanju operacije bistveno boljši kot dr. Novak. Ali lahko tehnik legalno opravi operacijo? (člen 5)
2. Drugi znanstvenik, dr. Laznik (ki ni opravil tečaja za delo s poskusnimi živalmi) bi rad naredil isti poskus. Dr. Novak pravi, da lahko prihrani 200 EUR (kar je strošek, ki nastane pri oddaji Vloge za pridobitev dovoljenja za poskus na živalih) in čas 2 mesecev (kolikor povprečno traja, da se dobi dovoljenje za delo s poskusnimi živalmi) in naredi poskus pod licenco dr. Novaka. To tudi pomeni, da dr. Novaku ne bi bilo treba opraviti tečaja. Ali je pot, po kateri postopajo, dovoljena? (člen 5 in 6, Priloga 4)
3. Glede na dovoljenje za poskus, ki ga ima dr. Novak, dr. Laznik naredi poskus na črevesju – črevesne anastomoze, ker se mu zdi to bolj zanimivo in pomembno. Ali je to dovoljeno? Na žalost po operaciji ne skrbi pravilno za živali in to opazi strokovnjak za zaščito živali iz njihove inštitucije. Ali lahko ima dr. Novak težave z Veterinarsko upravo Republike Slovenije (VURS)? Pravzaprav je dr. Laznik tisti, ki je storil napako.
4. Kdo je usposobljen, da dnevno skrbi za živali? (člen 12)
5. Dr. Novak ima še enega tehnika, ki je opravil tečaj za oskrbnika. Ta želi na dopust in da bi bil dela prost vsak drugi vikend. Dr. Novak je prepričal drugega zaposlenega, ki ima opravljen tečaj za izvajalca poskusov, da skrbi za živali, ko ni tehnika v službi. Ali je to dovoljeno? Če

njega ni, naj bi za živali poskrbel doktor veterinarske medicine, ki dela v istem laboratoriju. Ali je to dovoljeno?

6. Dr. Novak je opravil na prašiču operacijo, pri kateri je premaknil arterijo z desne noge v srce. Po 14 dneh se prašič počuti dobro. Da bi dr. Novak prihranil drugega prašiča za naslednji poskus, bi rad ponovil postopek na istem prašiču, s tem da bi uporabil arterijo z leve noge istega prašiča. Ali je to dovoljeno? (člen 11)
7. Dr. Laznik pozna znanstvenika dr. Kranjca. Dr. Kranjc ima dovoljenje za poskus, v katerem lahko naredi točno tisto operacijo na črevesju, ki bi jo želel opraviti dr. Laznik. Dr. Kranjc dovoli, da dr. Laznik opravi eksperiment pod njegovim dovoljenjem za poskuse na živalih, ker so v preteklosti dobro sodelovali. Vendar dr. Laznik nima denarja, da bi kupil prašiče. Dr. Laznik se posvetuje z dr. Novakom o svojem problemu. Dr. Novak mu je voljan prepustiti prašiče, ko na njih opravi eksperimente na srcu. Ali je ta pristop dovoljen? (člen 11)
8. Dr. Kralj je strokovnjak za zaščito živali na Veterinarski fakulteti. Pri svojem raziskovalnem delu dobi idejo za zelo zanimiv poskus na miškah. Napiše vlogo za dovoljenje za delo s poskusnimi živalmi, v poskusu ima vlogo vodje in izvajalca poskusa. Ali je to dovoljeno? Kakšna so pooblastila strokovnjaka za zaščito živali?

Skupina 2: Zakonske zahteve glede nastanitve živali

1. Dr. Novak želi prihraniti stroške porabe elektrike. Zato se je odločil, da bi ugasnil luči v vseh sobah, kjer se nahajajo živali in je prisoten naraven vir svetlobe. Je to dovoljeno? (Priloga 1)
2. Zaposleni v raziskovalni skupini dr. Novaka želi opraviti poskus na mačkah. Vendar v vseh sobah, kjer je dovoljeno imeti živali, se nahajajo miši in podgane. Dr. Novak pravi, da je dovoljeno imeti mačke in miši v isti sobi, ker bodo mačke in miši v kletkah brez možnosti fizičnega kontakta. Je to dovoljeno? (Priloga 1)
3. Ali lahko imamo v eni kletki več samčkov miši? (Priloga 1)
4. Ali lahko imamo v kletki samo enega samčka miši? (Priloga 1)
5. Ali lahko za raziskave uporabljamo zaščitene živali? (člen 8)
6. Ali lahko uporabljamo za raziskave divje živali? (člen 8)
7. Ali lahko za raziskave uporabimo ribo, ki jo je ulovil ribič, ne da bi za to imeli dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS)? (člen 8)

Skupina 3: Zakonske zahteve glede izvora poskusnih živali

1. Ali lahko v poskusu uporabljamo svojo domačo žival (kunca, morskega prašička, prašiča, kokoš, mačko, psa)? (člen 8)
2. Ali lahko kupimo morskega prašička v Mr. Petu v nakupovalnem centru in ga uporabimo v poskusu? (člen 8)
3. Ali lahko kupimo kravo od kmeta in jo uporabimo v poskusu? (člen 8)
4. Mačka, ki se nahaja v Centru za eksperimentalne živali, je skotila pet mladičkov. Ali jih lahko uporabimo v poskusu?
5. Ali lahko uporabimo v poskusu potepuške pse ali pa pse iz zavetišča? (člen 8)

6. Mačka za uporabo v poskusu stane 1000 EUR. Sorodnik dr. Novaka ima na svoji kmetiji veliko mačk, ki so zelo plodne in je pripravljen, da bi gojil mačke za uporabo v poskusih. Za mačko bi računal 100 EUR. Ali je to dovoljeno? (člen 8)
7. Ali je dovoljeno kupiti miške, jih evtanazirati in odstraniti organe in jih uporabiti za študije brez dovoljenja za poskus od Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS)?
8. Ali je dovoljeno kupiti psa, ga evtanazirati in odstraniti organe in jih uporabiti za študije brez dovoljenja za poskus od Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS)?
9. Ali je dovoljeno po poskusu odnesti domov kunca in ga imeti za hišnega ljubljénčka, potem ko je poskus končan? (člen 11)

Skupina 4: Zakonodaja na področju poskusov na živalih

1. Dr. Novak ima dovoljenje za poskus, da premakne arterije iz zadnje noge pri prašiču v srce. Najprej pa bi vadal potek operacije na podganah, ker so cenejše. Ali je to dovoljeno? (Priloga 4)
2. Dr. Novak je načrtoval poskuse na univerzi, ampak operacijo lahko opravi tudi na prašičji farmi pri svojem svaku, kjer so prašiči lahko tudi nastanjeni, kar je bistveno bolj ekonomično. Ali je to dovoljeno? (Priloga 1)
3. Ali lahko njegov svak prašičem vbrizga penicilin in protibolečinsko sredstvo med operacijo?
4. Ali lahko za poskuse uporabljamo pajke brez dovoljenja Veterinarske uprave Republike Slovenije?
5. Ali lahko za poskuse uporabljamo rake brez dovoljenja Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS)?
6. Ali ima Veterinarska uprava Republike Slovenije (VURS) dostop do dokumentov, ki se uporabljajo v poskusu?
7. Vzgojili smo zelo lepe transgene miške, ki imajo krasen večbarven, mehak kožušček, dolge trepalnice, velike modre oči, na repu imajo krasno dlako podobno kot veverice. Še lepše je to, da njihov urin ne smrdi in proizvajajo zelo malo urina in blata. Ali jih je dovoljeno odnesti domov za hišne ljubljénčke?
8. Dr. Potočnik je zdravnik in ima dovoljenje, da odstrani jajčnike mačkam v poskusu, ki vključuje hormonalne študije. Ali je dovoljeno, da dr. Potočnik doma opravi isti postopek pri mački, ki jo ima kot hišno ljubljénko, da prepreči brejost (pri mački)?
9. Ga. Kovačič je učiteljica v osnovni šoli in želi v pouk biologije vnesti več dinamike in vključiti žive živali. Ali lahko dobi dovoljenje, da uspava žabo za namene pouka? (člen 5)
10. Dr. Hribar bi želel opraviti poskus na prašičih. Prašiče bi anestetiziral, opravil poseg in jih v anesteziji nepovratno anestetiziral. Opravil bi nepovratni poskus. Ali je za to potrebno dovoljenje Veterinarske uprave Republike Slovenije (VURS)?
11. Dr. Novak bi rad vstavil arterijski kateter v karotidno arterijo pri podgani in hkrati še vstavil urinski kateter. Želi primerjati krvne in urinske parametre nekaj dni in nato evtanazirati podgano. Ima samo dovoljenje za vstavev katetra v karotidno arterijo, ima pa prijatelja dr. Zupančiča, ki ima dovoljenje za vstavev urinskega katetra. Ali lahko dr. Novak in dr. Zupančič kombinirata licence in naredita oba postopka na isti podgani? (Pomisli!).

40 RAVNANJE S PODGANAMI IN MIŠKAMI

Tomaž Snoj, Valentina Kubale

Čas trajanja: 1 ura

Praktična vaja

Vsak udeleženec naj iz kletke dvigne miško in podgano in jo poskusi pravilno učvrstiti.

RAVNANJE S PODGANAMI

Laboratorijske podgane so na splošno prijazne in normalno ne grizejo med ravnanjem z njimi. Dobro je, če podgane nekaj časa nežno držimo in božamo preden jih učvrstimo, da si olajšamo postopek. Če podgana čuti močno bolečino ali strah, lahko med rokovanjem ugrizne. Pogosto se bo podgana, preden bo ugriznila, tudi oglasila. Samci so na splošno bolj mirni kot samice.

Fiksacija podgane

Ko podgano dvigujemo iz kletke, jo objamemo z eno roko okrog trupa, takoj za sprednjimi nogami. Podgano postavimo hitro na drugo roko, ki je upognjena, da lahko podgana počiva z glavo ob pregibu roke, ob čemer se počuti varno (slika 1).



Slika 1

Večjih podgan ne dvigujemo za distalni del repa, ker lahko z zvijanjem repa povzročijo, da pride do krožnih ruptur kože na repu. Lažje podgane lahko dvignemo s čvrstim prijemom na bazi repa, tik pod odlakanim področjem (slika 2). Že sam dvig podgane za rep zanjo pomeni nevarnost. Podgane tega ne marajo, kar lahko privede do antagonističnega obnašanja, ko naslednjič poskušamo rokovati z njo.



Slika 2

Podgano lahko učvrstimo z eno roko, tako da jo primemo za vratno gubo (slika 3).



Slika 3

Lahko jo tudi učvrstimo s pomočjo obeh rok tako, da jo držimo od zadaj in s palcem in kazalcem objamemo vratno gubo, palec pri tem počiva pod spodnjo čeljustjo podgane, in s prsti druge roke okrog zadnjih nog (slika 4 – podoben prijem, vendar v obratni smeri).



Slika 4

Podgano moremo čvrsto držati, a ne premočno stiskati grla in prsi, da ne povzročimo težav pri dihanju.

Manjše podgane (manj kot 60 g) lahko učvrstimo kot miške (glej fiksacija miške).

Z desno roko primemo za rep podgane blizu baze repa kolikor se le da. Podgano dvignemo in jo položimo na vrh kletke, podgano pa še vedno držimo okrog repa z desno roko. S palcem in kazalcem leve roke podgano primemo za kožno gubo na vratu, vključno z kožo med uhljema. Podgano dvignemo v zrak in držimo rep fiksiran z mezinco ali prstancem leve roke. Desna roka je sedaj prosta za postopke kot je intraperitonealno injiciranje, in podgana je fiksirana v levi roki.

Primer drže pri intraperitonealnem injiciranju (slika 5).



Slika 5

RAVNANJE Z MIŠKAMI

Miške so naravni plen za podgane, ki so predatorji. To si je dobro zapomniti pri praktičnem delu, ko imamo miške in podgane skupaj v sobi. To pomeni, da ne smemo iz kletk jemati mišk in podgan istočasno.

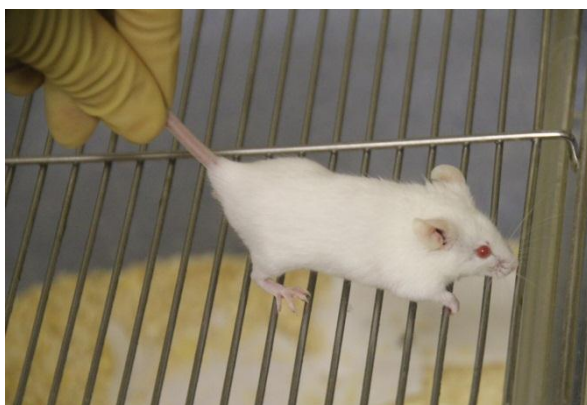
Miške so bolj nagnjene h grizenju kot podgane in jih je potrebno učinkovito, vendar nežno učvrstiti. Raje ne poskušajmo držati miške na roki, kot je opisano v poglavju pri podgani. Na srečo so posledice ugriza miške manj nevarne kot pri podgani. Samičke so ponavadi mirnejše od samčkov. Čeprav miškam ne postane sčasoma udobno pri ravnanju z njimi, kot

postane podganam, se odzovejo ugodno na nežno ravnanje.

Miško dvignemo iz kletke tako, da z desno roko primemo za rep in jo položimo na vrh kletke, da se lahko oprime rešetk (slika 1). S palcem in kazalcem leve roke miško takoj primemo za kožno gubo na vratu (slika 2, 3), vključno z kožo med uhljema in fiksiramo rep z mezinco ali prstancem leve roke in dlanjo (slika 4). Desna roka je sedaj prosta za postopke kot je intraperitonealno injiciranje in miška je fiksirana v levi roki.



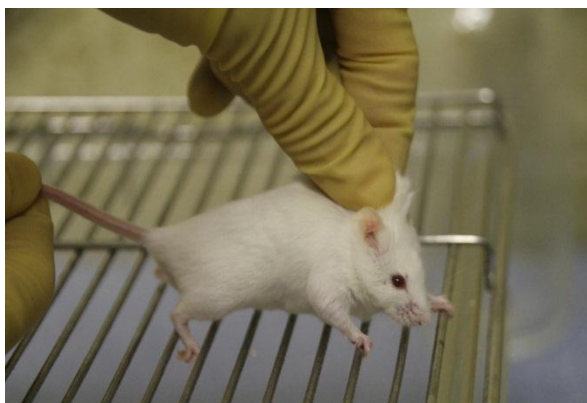
Slika 3



Slika 1



Slika 4



Slika 2

41 NEKROPSIJA LABORATORIJSKIH PODGAN KOT PRIPRAVA ZA KIRURŠKE POSEGE PRI ŽIVIH ŽIVALIH

Valentina Kubale, Mitja Gombač

Preden pričnemo s praktičnim delom, je zelo pomembno, da se seznanimo z anatomijo živali. Znanje pridobimo s študijem anatomskih atlasov in z učenjem na kadavrih, kjer je mogoče narediti večje reze in odpreti celotno operacijsko polje, kar nam omogoči opazovanje povezanosti anatomskih struktur.

Pri praktičnem delu, bodisi pri nekropsiji ali pri operaciji, je pomembno, da delamo zelo pazljivo. Če tkiva poškodujemo, težko opazimo nekatere podrobnosti.

Pri našem praktičnem delu se bomo seznanili s klasično sekcijo podgane, ki nam omogoči pregled večine tkiv in organov, predvsem tistih, ki so najbolj izpostavljena pri operacijah ali odvzemu organov in tkiv oz. njihovih vzorcev.

PROTOKOL DELA

1. Podgano postavimo v hrbtni položaj (slika 1). Kožo z nožem prerežemo od vrha brade do zadnjične odprtine po medialni črti ventralne strani trupla (slika 2). Z izkoževanjem začnemo najprej na desni (slika 3) in nato še na levi strani tik ob telesu, pri čemer polkrožno prerežemo mišice plečnega obroča in zadnjične mišice ter odpremo oba kolčna sklepa (slika 4).



Slika 1



Slika 2



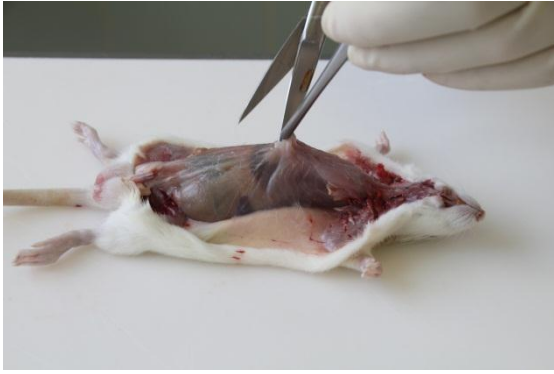
Slika 3



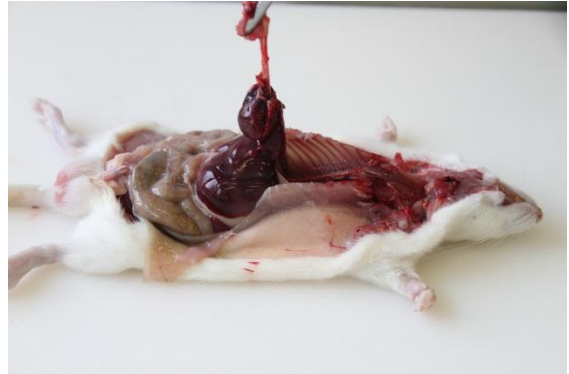
Slika 4

2. Trebušno votlino odpremo tako, da s pinceto povzdignemo trebušno steno in jo s tem odmaknemo od notranjih organov (slika 5). Nato naredimo rez po medialni liniji trebuha, ki ga začnemo pod ročajem prsnice (*processus xiphoidens*) in nadaljujemo do točke nad penisom pri samcih, pri samicah pa rez zaključimo kranialno od sednice.

Opazujemo debelino trebušne stene, ki je tanjša od kože na hrbtu. Opazujemo, kako se trebušne mišice z obeh strani združijo na sredini v beli liniji – *linei albi*. Ogledamo si položaj organov v trebušni votlini (slika 6).



Slika 5



Slika 8



Slika 6

3. Prsni koš odpremo s škarjami in pregledamo položaj organov prsne votline (slika 7). Odstranimo vratne organe in organe prsne votline: sapnik in požiralnik z nožem prečno prerežemo tik za glom, primemo ju s pinceto, vlečemo proti prsni votlini in z nožem režemo mehka tkiva na njuni dorzalni strani do vhoda v prsno votlino (slika 8). Nato ju primemo z roko, povlečemo do diafragme in ju v organski zvezi s srcem in pljuči prerežemo tik pred trebušno prepono. Pogledamo srce in pljuča.



Slika 7: 1 – cekum; 2 – jenunum;
3 – želodec; 4 – jetra



Slika 9

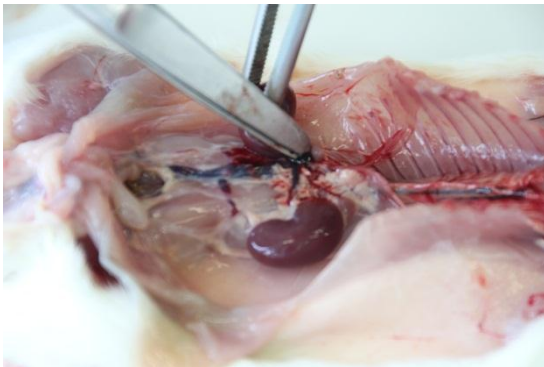


Slika 10

4. Odstranimo organe trebušne votline: rektum blago povlečemo iz medenične votline in ga z nožem prečno prerežemo pred vhodom v medenično votlino (slika 9). Nato režemo mezenterij ob mezenterialnem korenu proti glavi (slika 10) ter v enem kosu odstranimo črevesje, želodec s pečo, mezenterij z mezenterialnimi bezgavkami, vranico in trebušno slinavko. Z nožem odstranimo jetra. Ledvici, nadobistnici in sečni mehur pregledamo *in situ* (slika 11, 12).



Slika 11



Slika 12

5. Pregledamo jetrne režnje. Poskusimo jih določiti. Pozorni smo na to, da podgana nima žolčnika. Poiščemo portalno veno (*v. portae*) in žolčno izvodilo.

6. Prerežemo želodčno-vranično vez in pregledamo vranico. Poiščemo trebušno slinavko in jo pregledamo (slika 13).



Slika 13

7. Pri samcih moda (na njih je vidno zelo karakteristično belo telesce) potegnemo iz modnika ali pa modnik prerežemo. Pregledamo arhitekturo žil in poiščemo semenovod (slika 14).



Slika 14

8. Pregledamo pomembne žile *in situ*. Pripravimo se za izolacijo velikih vratnih žil. Kožo na področju spodnje čeljustnice (*mandibule*) razširimo, tako da lahko vidimo vratno muskulaturo. Poiščemo veliko veno v vratu – *v. jugularis* in veliko arterijo *a. carotis*. S pomočjo pincete in škarij odmaknemo mišice.

9. Poskusimo izolirati velike žile v zadnji okončini. Rez naredimo na sredini medialne strani stegna od kolena do trebušne stene. Poiščemo veliko veno stegna – *v. femoralis* in veliko arterijo stegna – *a. femoralis*.

10. Podgano obrnemo na trebuh. Z brivnikom pobrijemo hrbet od vratu do sredine ledvene regije. Poskusimo odstraniti dlake čim bližje koži, ne da bi jo poškodovali.

Sedaj vadimo nefrektomijo (odstranitev ledvic). S skalpelom naredimo incizijo medialno ob hrbtenici (slika 15). Pregledamo debelino kože. S škarijami in s topo preparacijo odmaknemo kožo in spodaj ležeče mišice. S prstom otipamo, kako močne so mišice hrbta, jih odmaknemo ter zatipamo mehko in tanko abdominalno muskulaturo. Poskušamo določiti položaj ledvice. Ledvico približamo inciziji. Ugotavljamo, kako močno tenzijo prenese tkivo (slika 16).



Slika 15



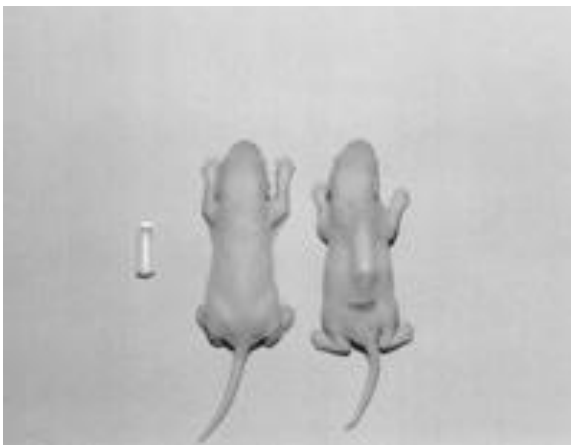
Slika 16

11. Vadimo še pripravo subkutanega žepka za minipumpo (ki jo potem uporabljamo pri doziranju zdravil).

Naredimo dolgo incizijo na koži med rameni. Pod kožo potisnemo pinceto ali škarje in zrahljamo subkutano tkivo. Razpremo kraka pincete, s tem razmaknemo podkožno tkivo in naredimo podkožni žep (sliki 17 in 18).



Slika 17



Slika 18

Za bodoče kirurške posege si je dobro zapomniti, da je nekropsija, kot smo jo imeli na tečaju, zelo uporabna za našo pripravo na operacijo. Ko vadimo različne tehnike operacij

na kadavru, smo bolj mirni in sproščeni ter lažje najdemo organe in tkiva, ki nas zanimajo. Taka tehnika obenem pomaga pri učenju lokacije organov in tkiv in njihovih medsebojnih povezav.

LITERATURA

1. Department of experimental medicine, University of Copenhagen & University hospital: Kursus i Forsøgsdyrskundskab C; Øvelsesvejledning, revised 2008.

Čas trajanja: 2 uri

Pri poskusnem delu so funkcije, ki jih spremljamo pri obnašanju, razdeljene na:

- funkcije, ki so pomembne pri vidu, sluhu, vonjanju, dotiku ... ipd.
- motorne funkcije (gibanje)
- kognitivne funkcije (učenje in spomin)

Obstaja veliko različnih testov obnašanja, ki vključujejo elemente ene ali več zgoraj omenjenih kategorij. Nekaj testov obnašanja pa se osredotoča na en sam vidik obnašanja. Na primer učenje temelji na delovanju čutil. Če želimo opravljati teste bolj obsežnega vedenja živali, pa je potrebno osnovati večje število testov.

Pri tem praktičnem delu se bomo srečali s t. i. Functional Observational Battery (FOB), testom za določanje obnašanja podgan, to je metoda, namenjena splošnemu pregledu obnašanja laboratorijskih živali. FOB so razvili v zgodnjih devetdesetih letih in je bila komponenta direktiv OECD za izvajanje poskusov na živalih, pri katerih so testirali učinek različnih kemikalij na podganah in miškah. Metoda je bila namenjena pridobitvi začetnega vtisa o obnašanju živali. Rezultati metode so dokaj subjektivni, ker opažanja zapisuje opazovalec. Test obnašanja traja 10 minut na žival, če ga izvaja izvežbana oseba. Med testom opazovalec zapisuje v poseben obrazec vzorce obnašanja, ki jih opazi pri živali. Opazovalec tudi ne ve, ali so bile živali tretirane s kakšnimi substancami.

V nadaljevanju je opisan SOP (standard operating procedure) za podgane, s katerim opravljamo test FOB.

Udeleženci tečaja sledijo opisanemu standardnemu poteku. Testa za »gripping strenght« ne delamo, ker nimamo opreme. SOP je opisan na 9 straneh in vsebuje opis praktičnega izvajanja testa, sheme, po kateri zbiramo podatke (priloga 1) in priročnik za ocenjevanje (priloga 2).

FOB vključuje:

- opazovanje v domači kletki
- opazovanje med ravnanjem
- opazovanje na prostem polju
- testiranje refleksov/čutil
- testiranje motorične funkcije
- fizikalnih parametrov: telesna teža

V tem praktičnem delu 3 osebe sestavljajo eno skupino. Ena oseba kontrolira podgano, ena oseba je odgovorna za postopek in ena oseba za izpolnjevanje vprašalnika in ocenjevanje.

FOB

Namen opisane metode je opredeliti in analizirati različne tipe obnašanja pri podgani pred začetkom raziskave ali poskusa. Metoda ni pri vseh testih najbolj nežna in je subjektivna. Zaželeno je, da en opazovalec opazuje žival v vseh fazah poskusa, ker so rezultati deloma odvisni tudi od ocenjevalca. Test traja približno 10 minut na žival. Med preiskavo naj opazovalec vpisuje vse opazke v obrazec. Opazovanja se ocenjujejo glede na priročnik.

MATERIAL

- ura
- arena (odprto polje, 60 x 90 cm, s 7 cm stenami iz plastike) na mizi
- dno prekrijemo s čistim vpojnim papirjem
- kliker, baterija
- barva – vodenka, svinčnik, pisalo
- bel papir formata A4
- naprava za merjenje moči stiska (grip strenght) (÷)
- termometer (÷), tehcnica, pinceta

POSTOPEK PRI PODGANAH

Najprej podgano opazujemo v kletki. Opazovalec oceni **telesno držo**, **stopnjo odprtosti očesa**, morebitne **krče** in **oglašanje** podgane.

Nato opazovalec vzame podgano iz kletke in ocenjuje **reakcijo po rokovanju**, morebitno **piloerekcijo** (vzdigovanja dlake), **solzenje**, **slinjenje** ter **stopnjo odprtosti očesa**.

Podgano postavi v areno, ki je pokrita s čistim vpojnim papirjem. Pogleda na uro. V **3 minutah** opazuje, **kolikokrat se podgana postavi na zadnje noge** (tako, da sta obe prednji nogi dvignjeni v zrak), ali so prisotni **krči** (konvulzije), ocenjuje **karakteristike drže**, **s kakšno lahkoto se podgana premika** in kakšna je **stopnja budnosti oz. čuječnosti**. Po 3 minutah prešteje **količino bobkov blata** in **količino urina** v areni.

Nato testiramo reflekse podgan. Ocenjujemo odgovor podgane na izzivanja:

- a. s pisalom se pomaknemo proti glavi podgane, vendar se je ne dotaknemo
- b. rahlo sunemo/ustvarimo pritisk na zadnjici podgane
- c. metalčni zvok iz klikerja
- d. s pinceto stisnemo rep
- e. s svetlobo razširimo zenice

Nato podgano dvignemo v zrak na višino 30 centimetrov in jo spustimo na tla. Ocenjujemo njeno sposobnost, da pristane na nogah. Bel papir formata A4, na katerega napišemo individualno številko podgane, datum, številko poskusa ter inicialke opazovalca, postavimo na mizo in podgani pobarvamo blazinico 4. prsta na obeh zadnjih nogah.

Podgano dvignemo na višino 40 cm tako, da jo držimo z eno roko čez hrbet pod spodnjimi nogami, tako da je pripravljena, da pristane na zadnjih nogah, in jo spustimo na tla. To ponovimo dvakrat. Označimo pare obarvanih odtisov blazinic za kasnejše merjenje razdalje med njimi (angleško t. i. footsplay).

Moč stiska prednjih in zadnjih okončin se izmeri z eno ali več meritvami moči stiska na sprednjih in zadnjih nogah in 2 meritvi sta reprezentativni.

Podgano stehtamo in ji izmerimo telesno temperaturo (ne bomo merili na vajah).

Opazujemo tudi ostale posebne znake: eksoftalmus (izbuljene oči), rane okrog oči, rdečo obarvanost okrog oči, rane na prstkih in repu, manjkajoče kremplje, izgubo telesne teže ipd.

Podatki

Med testiranjem opazovalec zapisuje opazovanja v obrazec (priloga 1). Reakcije podgane ocenjuje glede na priložena navodila (priloga 2). Podatki stopinj se lahko v posebnih programih tudi analizirajo in obdelajo s statističnimi metodami. Podatki vsake posamezne živali so v preglednicah in jih lahko primerjamo. Opazovalec ali vodja študije pregleda podatke.

Obrazec 1 za vnos FOB (Functional observational battery data)

Številka študije: 2012 – Tečaj za delo s poskusnimi živalmi						
Čas opazovanja:						
Preizkušanje substanc / (temeljne raziskave):						
Datum:						
Številka živali						
Položaj telesa (1–7)						
Klonično premikanje (1–7)						
Tonično premikanje (0,1–5)						
Vokalizacija (0, 1)						
Odprtost oči (1–4)						
Težavnost prijema (1–6)						
Reakcija na rokovanje (1–4)						
Solzenje (1–3)						
Odprtost oči (1–4)						
Slinjenje (1–3)						
Piloerekcija (0,1)						
Število postavitev na zadnje noge v 3 min						
Klonično premikanje (1–7)						
Tonično premikanje (0,1–5)						
Drža (0,1–7)						
Rezultat drže (1–4)						
Rezultat mobilnosti (1–4)						
Zbujanje (1–6)						
Stereotipija (0,1), uporabi obrazec 2						
Nenavadno vedenje (0,1), uporabi obrazec 2						
Število bobkov v 3 minutah						
Število urinskih lužic v 3 minutah						
Reakcija na približanje s pisalom (1–5)						
Reakcija na dotik zadnjice (1–5)						
Reakcija na klik (1–5)						
Reakcija na stisk repa (1–5)						
Reakcija na svetlobo (0,1)						
Refleks pri padcu z zraka (1–4)						
Razmik nog 1 (mm)						
Razmik nog 2 (mm)						
Moč stiska prednje okončine 1						
Moč stiska prednje okončine 2						
Moč stiska zadnje okončine 1						
Moč stiska zadnje okončine 2						
Telesna teža (g)						
Telesna temperatura (°C)						
Ostalo (1, 2), uporabi obrazec 2						

Čas in inicialke opazovalca: _____

Obrazec 1 za vnos FOB (Functional observational battery data)

Opazovanja solzenja, stereotipij, čudnega obnašanja ali drugo

Številka študije: 2012 – Tečaj za delo s poskusnimi živalmi		
Čas opazovanja:		
Preizkušanje substanc / (temeljne raziskave):		
Datum:		
Številka podgane:	Datum:	Opažanje:

Čas in inicialke opazovalca: _____

Navodila za ocenjevanje FOB

Vse rezultate bomo tudi vpisali na tablo ali pa zbrali skupaj, da se lahko primerjajo rezultati, pridobljeni pri različnih podganah.

1. Opažanja v domači kletki - opravimo medtem, ko je podgana v miru v svoji kletki

a) Položaj telesa (1, 2, 3 – primeren/normalen)

- 1 – stoji ali sedi normalno
- 2 – obe prednji okončini nista na tleh
- 3 – spi na boku ali nagrbančena
- 4 – medlo leži na trebuhu, okončine so iztegnjene vstran
- 5 – leži na stani, noge so stegnjene vstran
- 6 – sedi v zgrbljeni poziciji
- 7 – kima z glavo

b) Nehotni motorni premiki – klonični krči (hitre kontrakcije in relaksacije mišic); 2 je primerno, normalno

- 0 – ni kloničnih krčev
- 1 – premikajoči premiki čeljusti
- 2 – (normalno) drhtenje okončin, ušes, glave ali kože
- 3 – rahel tremor (tresenje)
- 4 – močan ali podaljšan tremor
- 5 – mioklonični sunki (kratki premiki mišic, manj kot 6)
- 6 – klonični krči
- 7 – močni stresljaji (kot pri »mokrem psu«)

c) Nehotni motorni premiki – tonični (podaljšane kontrakcije mišic brez relaksacije)

- 0 – ni toničnega gibanja
- 1 – skrčenje mišic iztegovalk – povzročajo iztegnjenost okončin
- 2 – opistotonus – mišice hrbta so skrčene, povzročajo, da so glava, vrat in telo toga upognjeni nazaj
- 3 – emprostotonus – mišice trebuha povzročijo, da je telo toga upognjeno naprej
- 4 – eksplozivni skoki v zrak z vsemi štirimi okončinami, odlepljenimi od podlage
- 5 – resni klonično-tonični krči ki vodijo do respiratornih problemov, splošno poslabšanje po napadu, smrt

d) Vokalizacija oz. oglašanje – spontano cviljenje, ne kot reakcija na ravnanje

- 0 – ni
- 1 – je, se pojavlja

e) Stopnja odprtosti očesa

- 1 – oči so široko odprte
- 2 – veke so rahlo zaprte
- 3 – veke so napol zaprte
- 4 – veke so popolnoma zaprte

2. Opažanja po tem, ko podgano vzamemo iz kletke

a) Težavnost prijema

- 1 – zelo lahko (podgana je relativno pri miru in se ne odziva na to, da jo dvignemo v zrak)

- 2 – lahko (lahko cvili, se malo upira)
- 3 – zmerno težko (se postavi na zadnje noge, sledi opazovalčevi roki)
- 4 – kar težko (lahko še cvili)
- 5 – težko – teče po kletki, jo je težko ujeti, lahko cvili
- 6 – zelo težko

b) Reakcija na rokovanje

- 1 – šibka reakcija (ni upora, z lahkoto ravnamo z njo)
- 2 – zmerno lahko (se malo upira, lahko cvili)
- 3 – zmerno težko (zamrzne, je napeta, lahko se zdi toga, lahko cvili)
- 4 – močno (se zvija, poskusi ugrizniti, lahko cvili)

c) Solzenje

- 1 – ni solzenja
- 2 – slabotno
- 3 – močno

d) Odprtost oči

- 1 – oči so široko odprte
- 2 – veke so rahlo zaprte
- 3 – veke so napol zaprte
- 4 – veke so popolnoma zaprte

e) Slinjenje

- 1 – ni
- 2 – slabotno
- 3 – močno

f) Piloerekcija (dlaka se postavi pokonci, »staring coat«)

- 1 – kožušček je gladek in se tesno prilega telesu
- 2 – dlake stojijo pokonci, tudi če jih poravnamo z roko

3. Podgano prestavi na odprto polje in jo opazuj 3 minute (uporablaj uro)

Preštej kolikokrat se je podgana postavila na zadnje noge (dvignila obe sprednji nogi od podlage).

**a) Nehotni motorni premiki – klonični krči (hitre kontrakcije in relaksacije mišic);
2 je primerno, normalno**

- 0 – ni kloničnih krčev
- 1 – premikajoči premiki čeljusti
- 2 – (normalno) drhtenje okončin, ušes, glave ali kože
- 3 – rahel tremor (tresenje)
- 4 – močan ali podaljšan tremor
- 5 – mioklonični sunki (kratki premiki mišic, manj kot 6)
- 6 – klonični krči
- 7 – močni stresljaji (kot pri »mokrem psu«)

b) Nehotni motorni premiki – tonični (podaljšane kontrakcije mišic brez relaksacije)

- 0 – ni toničnega gibanja
- 1 – skrčenje mišic iztegovalk – povzročajo iztegnjenost okončin
- 2 – opistotonus – mišice hrbta so skrčene, povzročajo, da so glava, vrat in telo togo upognjeni nazaj

- 3 – emprostotonus – mišice trebuha povzročijo, da je telo toga upognjeno naprej
- 4 – eksplozivni skoki v zrak z vsemi štirimi okončinami, odlepljenimi od podlage
- 5 – resni klonično-tonični krči, ki vodijo do respiratornih problemov, splošno poslabšanje po napadu, smrt

c) Drža – če podgana ostane na istem mestu 3 minute, jo rahlo podrezaj, da lahko oceniš karakteristike drže

- 0 – normalna
- 1 – ataksija – nima koordinacije
- 2 – pretirano premikanje, vlečenje ali upogibanje navzven od zunanjih okončin
- 3 – noge so markantno upognjene navzven
- 4 – sprednje noge so iztegnjene ali skrčene in niso sposobne nositi telesne teže
- 5 – hodi po prstih
- 6 – je zgrbljena
- 7 – telo je sploščeno ob površino

d) Rezultat drže

- 1 – normalno, izberemo samo, če je odgovor iz prejšnje točke 0
- 2 – nizka stopnja nepravilnosti
- 3 – zmerna stopnja nepravilnosti
- 4 – huda škoda

e) Rezultat mobilnosti – sposobnost, kako se podgana premika, ne glede na njeno držo

- 1 – normalno
- 2 – nizka stopnja nepravilnosti
- 3 – zmerna stopnja nepravilnosti
- 4 – popolnoma nepravilna

f) Zbujanje – stopnja spontane aktivnosti in čuječnosti na odprtem polju

- 1 – zelo nizka (brez življenja, komatozna)
- 2 – nizka (apatična, rahlo zaznavni premiki glave in telesa)
- 3 – nekoliko nizka (rahlo apatična, malo raziskovalne dejavnosti s periodami nemobilnosti)
- 4 – normalna (zbujena, raziskuje)
- 5 – nekoliko povečana (rahla ekscitacija, napeta, nenadni gibi ali zamrzne)
- 6 – zelo visoka (preveč ekscitirana, nenadne epizode teka ali premikov telesa)

g) Stereotipija – opišite na obrazcu 2 obnašanje, ki je ponavljajoče ali pretirano, kot je kroženje, negovanje, ovohavanje, zmajevanje z glavo.

- 1 – ni
- 2 – da, se pojavlja

h) Nenavadno vedenje – opišite na obrazcu 2 nenavadno obnašanje, kot je samopohabljanje, hoja nazaj, padanje.

- 1 – ni
- 2 – da, se pojavlja

i) Število bobkov v 3 minutah – preštejemo. Označi »D« za drisko

j) Število urinskih lužic v 3 minutah – preštejemo. Označi »X« če je poliurija (zelo velike količine urina)

4. Reakcija na stimuluse – opravimo, ko je podgana na odprtem polju

a) Reakcija na približanje s pisalom:

- 1 – ni reakcije
- 2 – podgana se počasi približa, povoha in se obrne v stran
- 3 – podgana zamrzne, opazimo kontrakcijo mišic
- 4 – bolj zaznavna verzija 2 in 3
- 5 – pretirana reakcija – skače, grize ali napade

b) Reakcija na dotik zadnjice

- 1 – ni reakcije
- 2 – podgana se počasi približa, povoha in se obrne v stran
- 3 – podgana zamrzne, opazimo kontrakcijo mišic
- 4 – bolj zaznavna verzija 2 in 3
- 5 – pretirana reakcija – skače, grize ali napade

c) Reakcija na klik: kliker držimo 5 cm nad hrbtom podgane od zadaj, nenadno kliknemo

- 1 – ni reakcije
- 2 – podgana se počasi približa, povoha in se obrne v stran
- 3 – podgana zamrzne, opazimo kontrakcijo mišic
- 4 – bolj zaznavna verzija 2 in 3
- 5 – pretirana reakcija – skače, grize ali napade

d) Reakcija na stisk repa: rahlo stisnemo rep 2-3 cm nad konico, vendar dovolj močno, da izzovemo reakcijo na bolečino pri normalni podgani

- 1 – ni reakcije
- 2 – podgana se počasi približa, povoha in se obrne v stran
- 3 – podgana zamrzne, opazimo kontrakcijo mišic
- 4 – bolj zaznavna verzija 2 in 3
- 5 – pretirana reakcija – skače, grize ali napade

e) Reakcija na svetlobo: uporabi svetlobo, da sprožiš kontrakcijo zenice na enem očesu, nato ponoviš še na drugem

- 0 – ni kontrakcije
- 1 – kontrakcija

f) Refleks pri padcu iz zraka – drži podgano v zraku z obema rokama, tako da leži na hrbtu v iztegnjeni poziciji, 30 cm nad površino. Nenadno jo spusti (NE, če je podgana poškodovana ali oslABLJENA in bi jo postopek lahko poškodoval)

- 1 – normalno, podgana pristane na nogah
- 2 – rahlo nekoordinirano
- 3 – pristane na strani
- 4 – pristane na boku

g) Razmik nog – z malo količino netoksične barve pobarvaj blazinice 4. prsta podgan na obeh zadnjih nogah. Podgano dvigni v zrak 40 cm in jo drži čez prsi 40 cm nad podlago. Dovolj podgani, da pade na kos belega papirja. Označi razdaljo med odtiski nog. Ponovi. Zmeri z ravnilom. Povprečje se šteje kot končni rezultat.

h) Moč stiska okončin – se meri s posebnim aparatom, ki ga na žalost nimamo. Lahko držiš podgano nad kletko in poskusiš subjektivno oceniti njeno moč.

i) Telesna teža (g) – stehtaš na tehtnici

j) Telesna temperatura (°C) – se izmeri s termometrom za otroke. Na vajah ne bomo merili telesne temperature.

k) Ostalo – uporabi obrazec 2 – če najdeš npr. odlomljene zobe, nohte, umazano ali razbarvano kožo, kraste okrog nosa ali oči, rdečo obarvanost okrog oči ipd.

Čas trajanja: 1 ura

Praktična vaja: Vsak udeleženec osvoji tehniko zapiranja rane z enojnimi šivi

Incizijo zapremo tako, da s šivalnim materialom zblížamo robove rane in dosežemo primarno celjenje (*per primam*). Za primarno celjenje je potrebno robove rane natančno približati, to dosežemo z nastavljanjem zelo enostavnih šivov in uporabo čim manj šivalnega materiala. Šivi, ki so pretesni ali preveč skupaj, lahko povzročijo ishemijo robov rane, ki lahko resno prizadene celjenje.

Če sega rana čez več plasti, npr. kožo, podkožje in mišice, je potrebno vsako plast zapirati ločeno od drugih.

Šivi spajajo med seboj po konsistenci in po anatomske lokalizaciji različna tkiva in nevtralizirajo različno velike sile, zato je pomembno, da:

- za šiv vedno uporabimo pravo nit,
- ga napravimo na pravem mestu,
- zanesljivo zavežemo vozeli in
- ga zategnemo z ravno prav veliko silo.

Za vajo potrebujemo:

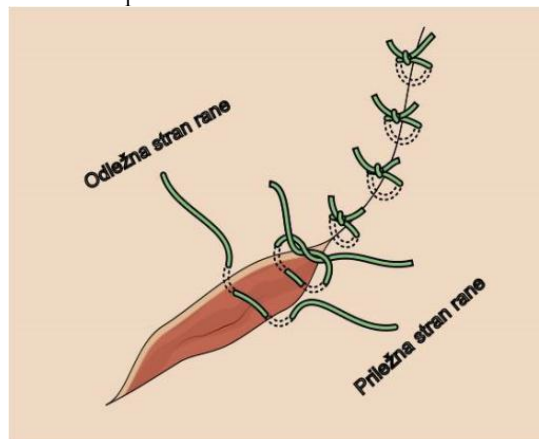
- instrumente (pinceta, škarje, šivalnik in skalpel),
- svinjsko nogico, fiksirano na lesenem držalu,
- skalpel in šivalni material,
- rokavice za enkratno uporabo.



Slika 1. Potrebni instrumenti in pripomočki za izvedbo vaje.

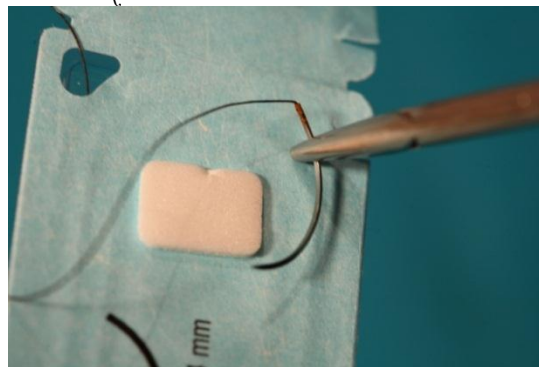
Posamezni šivi

Najpogostejši šiv za spenjanje kože je enostavni posamezni šiv.

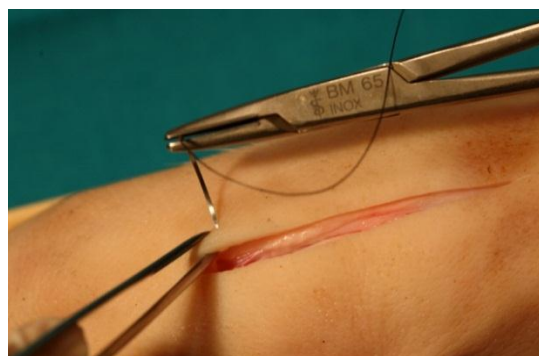


Slika 2. Strani rane in enostavni posamezni šivi.

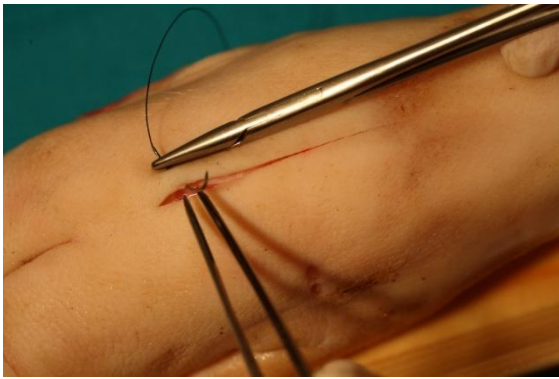
Tehnika izdelave šiva:



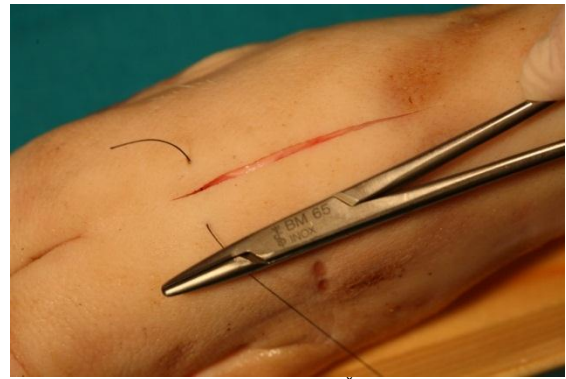
Slika 3. Iglo držimo s šivalnikom v osnovnem položaju, tako da je na ušesni strani ena tretjina igle, na strani konice pa dve tretjini igle.



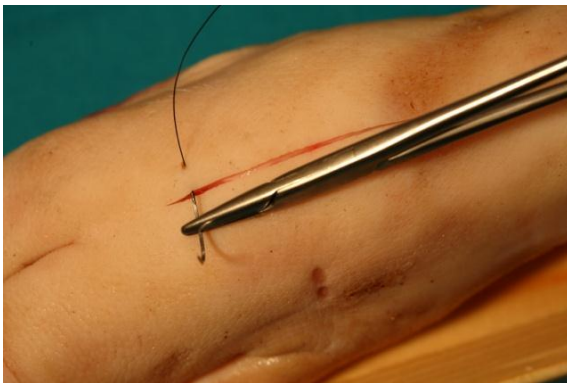
Slika 4. S kirurško pinceto dvignemo rob rane na priležni strani roke, pri tem kožo rahlo napnemo. Konico igle postavimo na napeti del kože in z rotirajočim premikom zapestja predremo kožo pravokotno na incizijo. Z iglo prebodemo kožo, ki jo fiksiramo s pinceto.



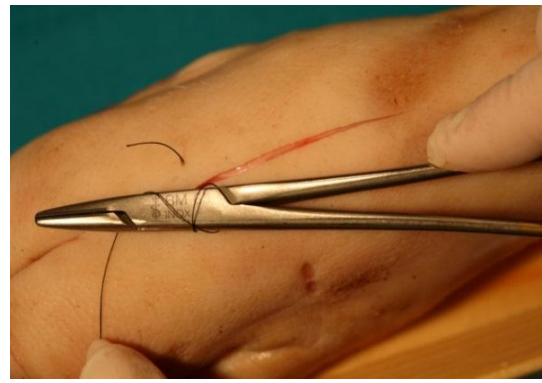
Slika 5. S šivalnikom primemo iglo na ušesni strani in jo potiskamo skozi kožo, dokler večina igle ne pogleda skozi kirurški rez.



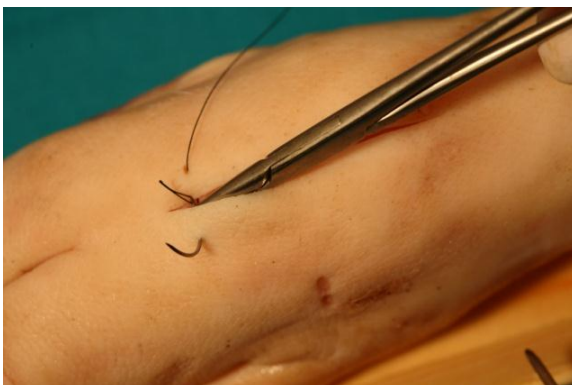
Slika 8. Iglo držimo v roki. Šivalnik položimo med oba konca niti paralelno na incizijo tako, da je bližje daljšemu koncu niti.



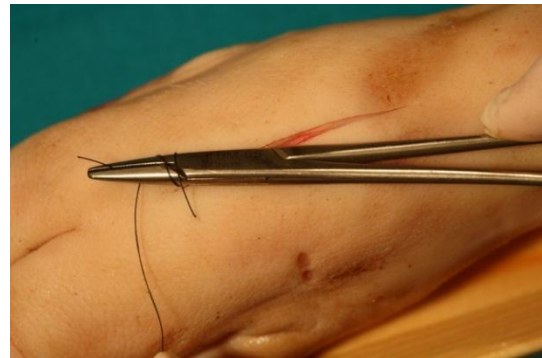
Slika 6. Iglo preprimemo na sredini in jo izvlečemo iz rane.



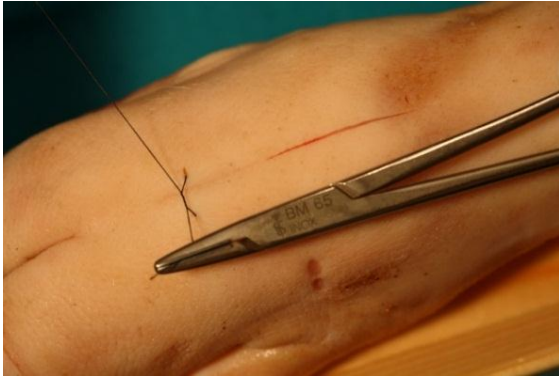
Slika 9. Daljši konec niti 2x ovijemo okoli konice šivalnika.



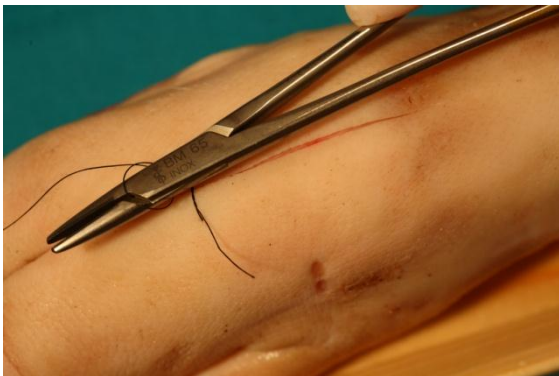
Slika 7. Iglo prenesemo na drugo stran rane in jo na enak način potisnemo skozi kožo in izvlečemo (na obeh straneh rane naj igla potuje skozi tkivo v enaki razdalji od roba rane).



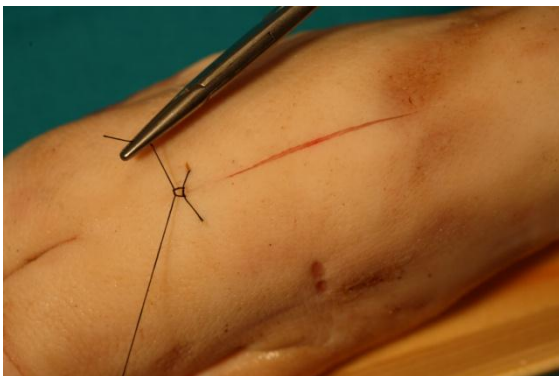
Slika 10. Nato s šivalnikom primemo krajši konec in ga izvlečemo v smeri drugega roba rane.



Slika 11. Prvo etažo zategnemo tako, da enakomerno povlečemo oba konca.



Slika 12. Šivalnik položimo na daljši konec niti, ki jo 1x ovijemo okoli konice.



Slika 13. Nato s šivalnikom primemo krajši konec niti in ga povlečemo proti odležni strani rane, daljši konec niti pa povlečemo proti priležni strani rane. Vozel zategnemo in postopek ponovimo.

Slabe lastnosti enostavnega posameznega šiva:

- slabša adaptacija posameznih slojev kože,
- neenakomeren pritisk na robove rane,
- če je šiv slabe kakovosti in premočno zategnjen, lahko prereže kožo,
- brazgotinjenje in slabši estetski videz.

Dobre lastnosti enostavnega posameznega šiva:

- enostavna tehnika šivanja,
- natančno zajemanje globine podkožja,
- možnost selektivnega predčasnega odstranjevanja šivov,
- preprosto odstranjevanje.

43 DAJANJE PRIPRAVKOV, JEMANJE KRVI TER EVTANAZIJA PRI PODGANAH IN MIŠKAH

Tomaž Snoj,
Silvestra Kobal, Marjana Grandič,
Valentina Kubale

Namen

Prikazati in spoznati tehniko različnih načinov aplikacije pripravkov, jemanja krvi in izvedbo evtanazije. Udeleženci obenem vadijo izvajanje fiksacije pri podganah in miškah. Pri vajah sodelujeta po dva udeleženca tečaja.

Materiali

- 1 podgana in 1 miš za 2 osebi,
- različne velikosti igel in injekcijskih brizg,
- mikrohematokritske cevke,
- izotonična raztopina NaCl (0,9-odstotna),
- 70-odstotni etanol,
- orogastrična sonda,
- tehtnica,
- pripomočki za fiksacijo živali.

Pri parenteralni aplikaciji moramo upoštevati splošna načela dajanja zdravil:

- pripravki morajo biti ogreti na telesno temperaturo;
- raztopine za aplikacijo morajo biti sterilne;
- mesto aplikacije je potrebo razkužiti;
- uporabljamo pribor (injekcijske igle) primernih dimenzij za posamezno živalsko vrsto in način aplikacije;
- uporabljamo sterilni pribor za enkratno uporabo;
- odmerek pripravka določamo na osnovi telesne mase živali, zato je potrebno žival predhodno stehtati;
- ob izvedbi aplikacije mora biti žival ustrezno fiksirana;
- uporabljeni pribor neškodljivo odstranimo.



Slika 1. Tehtanje podgane.

Subkutana aplikacija (SC) pri podganah in miših – vnos v podkožje

Ob upoštevanju splošnih načel dajanja zdravil izvedemo SC-aplikacijo v kožno gubo, ki jo naredimo z dvigom kože na hrbtu med plečnicama. Po vbodu in pred aplikacijo je potrebno aspirirati (bat brizge potegniti nekoliko nazaj), s čimer se prepričamo, da nismo pomotoma zadeli krvne žile. V primeru izvedbe vaje kot pripravek za aplikacijo uporabljamo fiziološko raztopino. Miši lahko v podkožje vnesemo do 0,5, podgani pa do 2 ml pripravka.

Intraperitonealna aplikacija (IP) pri podganah in miših – vnos v trebušno votlino

Fiksacijo podgane izvedemo, kot prikazuje slika 2. Kožno gubo naredimo na kavdalnem desnem področju abdomna med zadnjo nogo in medialnim področjem abdomna. S tem zmanjšamo možnost poškodbe oziroma aplikacije pripravka v slepo črevo, ki se v trebušni votlini nahaja na levi strani. Področje vnosa pripravka razkužimo.



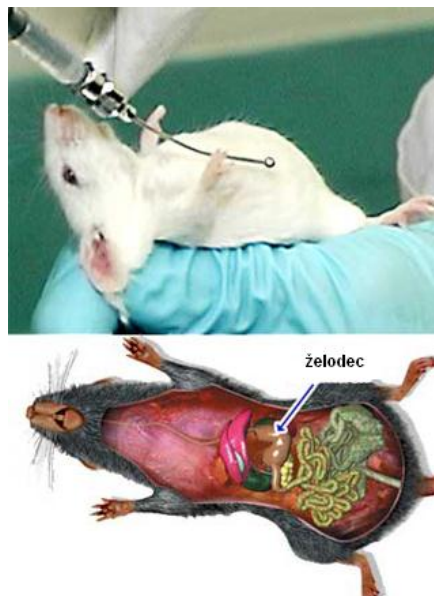
Slika 2. Prijem podgane za dajanje pripravka IP.

Pri podgani se vbod izvrši preko trebušne stene približno 3 mm od popka, pri miški pa 2 mm. Po vbodu igle v kožno gubo izvedemo aspiracijo, s čimer preverimo položaj igle v trebušni votlini. Za tem pripravek apliciramo. IP lahko miši apliciramo 2 do 3, podgani pa 5 do 10 ml raztopine.

Peroralna aplikacija (PO) s pomočjo orogastrične sonde pri podgani

Podgano fiksiramo vertikalno, kot je opisano v poglavju Ravnanje s podganami in miškami (Slika 3), tako da imamo palec in kazalec okrog kožne gube na hrbtni strani vratu in močno zategnemo kožno gubo. Podgana naj bo čim bolj zravnana v liniji od nosa do konice repa. Sondo vstavimo skozi usta, preko jezika in žrela v požiralnik. Uvajanje sonde v požiralnik naj bi potekalo brez upora. Če se začne žival upirati, je to lahko znak, da vrat podgane ni dovolj nagnjen nazaj ali da je sonda zašla v sapnik. Ob tem se pojavi tudi oteženo dihanje. Pri izvajanju PO-aplikacije moramo biti na to posebej pozorni, saj bi vnos tekočine v dihala lahko povzročil pogin živali.

Ko sondo po pravilnem postopku vstavimo v požiralnik, lahko vnesemo pripravek. Miški lahko PO apliciramo do 1, podgani pa 3 do 5 ml tekočine.



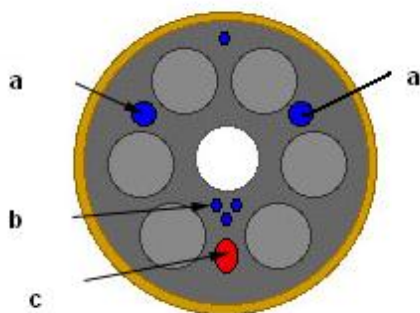
Slika 3. PO-aplikacija pri podgani.

Intravenozna aplikacija (IV) pri podganah

IV-aplikacijo pri podganah izvedemo v repno veno. Položaj repnih ven prikazuje slika 5. Podgano fiksiramo s pomočjo posebne kletke (Slika 4).



Slika 4. Primer kletke za fiksacijo podgane.



Slika 5. Položaj repnih ven in arterij pri miši in podgani. Modro obarvane so označene repne vene, rdeče pa repna arterija. (a) lateralni repni veni, (b) skupke treh manjših repnih ven, (c) repna arterija

Velikost premera krvnih žil lahko povečamo tako, da rep ogrejemo. Razširjenje žil lahko povzročimo tudi z masažo repa ali z rahlim drgnjenjem repa z vato, prepojeno s 70-odstotnim etanolom. Pri albino živalih razširjene vene presevajo skozi kožo.

Rep razkužimo. Iglo postavimo vzporedno z repom živali in jo zabodemo v kožo repa v smeri proti glavi živali. Z aspiriranjem preverimo, ali je igla v veni, pri čemer kri preide v injekcijsko brizgo. Kri ima veliko pufersko kapaciteto, zato lahko IV apliciramo tudi snovi, katerih pH odstopa od pH krvi (7,4). Vbod izvedemo čim bolj na konici repa, saj žile na tem mestu potekajo bolj na površini. Če nam vene ne uspe najti v prvem poskusu, naslednji vbod izvedemo v smeri proti korenu repa. Posebno nevarnost pri IV-aplikaciji predstavljajo zračni mehurčki v injekcijski brizgi, ki jih moramo pred aplikacijo odstraniti. Miši lahko IV apliciramo 0,2, podgani pa 1 ml raztopine.

Jemanje krvi iz repne vene pri podgani

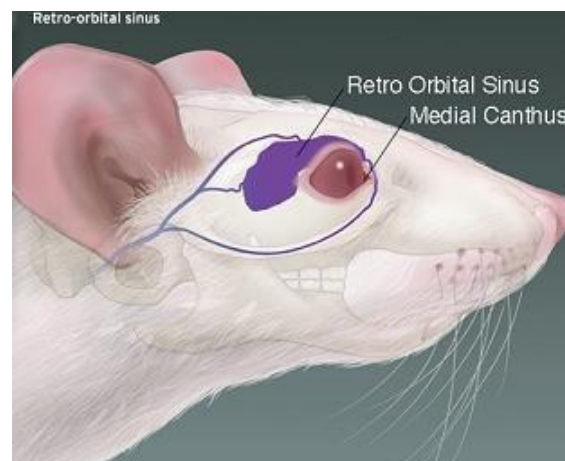
Kri lahko jemljemo iz dveh lateralnih repnih ven, manjše dorzalne repne vene ali pa ventralne repne arterije (Slika 5). Podgano fiksiramo v posebni kletki (Slika 4). Rep razkužimo. Lahko ga segrejemo ali pa razširitev žil dosežemo z eno izmed opisanih metod. V veno vstavimo iglo. Kri, ki kaplja iz igle, zberemo v ustrezni epruveti. Krv iz repa ne iztiskamo. Naenkrat lahko vzamemo 10 % celotne krvi. Količina krvi v organizmu je 70 ml/kg, kar pomeni, da ima podgana s telesno

maso 300 g 21 ml krvi. Takšni podgani lahko torej vzamemo največ 2 ml krvi.

Jemanje krvi iz retroorbitalnega venskega pleteža

Iz retroorbitalnega venskega pleteža lahko jemljemo kri le pri živali v splošni anesteziji. Anestezirano podgano položimo na levi bok. S palcem in kazalcem leve roke fiksiramo glavo podgane in razpremo očesni vek. Zaradi ležečega položaja podgane se pojavi zapora venske drenaže krvi iz glave, kar povzroči manjšo izbuljenost oči. Za jemanje krvi uporabimo mikrohematokritsko cevko.

Cevko vstavimo v medialni očesni kot na notranjo stran kostnega loka očesne votline (Sliki 6 in 7). Če cevko postavimo pravilno, dobimo kri z manjšim pritiskom in rotacijo cevke, ki se napolni s krvjo (Slika 8). Po odvzemu krvi cevko odstranimo in zapremo vek, dokler se krvavitev ne ustavi. S to tehniko lahko v nekaj sekundah pri podgani odvezamemo 2 ml, pri miši pa 100 μ l krvi. Pri enem jemanju krvi ne smemo odvzeti več kot 10 % volumna krvi. To pomeni, da lahko miši s telesno maso 25 g odvezamemo do 170 μ l krvi.



Slika 6. Anatomski položaj retroorbitalnega pleteža.



Slika 7. Jemanje krvi iz retroorbitalnega pleteža.



Slika 8. Rotacija hematokritske cevke pri jemanju krvi iz retroorbitalnega pleteža.

Evtanazija podgane z uporabo CO₂

Za izvedbo evtanazije potrebujemo komoro za žival ter izvor CO₂. Žival položimo v komoro, napolnjeno s CO₂, jo nepredušno zapremo in vanjo dodatno dovajamo CO₂. Visoka koncentracija CO₂ v komori, ki z dihanjem preide v kri, povzroči acidozo in posledično padec pH vrednosti cerebrospinalne tekočine, kar na neboleč način vodi v odpoved življenjskih funkcij. Žival pustimo v komori s CO₂ 20 minut.

Evtanazija miši s spremembo položaja vratnih vretenc (cervikalno dislokacijo)

Na vajah bo prikazan način usmrčitve miške s pomočjo cervikalne dislokacije. Dislokacijo (nateg in rotacijo vratu) lahko izvaja le usposobljena oseba.

Miško položimo na kletko, kot je to opisano v poglavju vaj Ravnanje z živalmi – Slika 1. S palcem in kazalcem desne roke jo držimo v področju vratu, s palcem in kazalcem leve roke pa jo primemo za rep, čim bližje bazi repa. S palcem desne roke naredimo premik naprej pod kotom 30–45° in hkrati potegnemo z drugo roko rep nazaj. Oba premika morata biti koordinirana in hitra. Namesto palca in kazalca desne roke si lahko pomagamo s pinceto ali škarijami (Slika 9).

Ločitev vretenc od lobanje povzroči hude poškodbe možganskega debla in takojšnjo nezavest. Poteg mora biti dovolj močan, da se obenem pretrgajo vratne arterije.

Dislokaciji vratu sledi takojšnja izkrvavitev ali uničenje možganov.



Slika 9. Položaj za evtanazijo miške s cervikalno dislokacijo s pomočjo škarij.

LITERATURA

1. Tomaž, Snoj, Valentina, Kubale. Praktične vaje: Ravnanje s podganami in miškami (v učbeniku).
2. Silvestra, Kobal, Robert, Frangež: Načini aplikacije pripravkov poskusnim živalim; postopki in principi (v učbeniku).

45 NAVODILA ZA OBDELAVO ČLANKA

Valentina Kubale

Udeleženci so razdeljeni v skupine po dva. Vsaka skupina dobi članek s področja znanosti o laboratorijskih živalih, ki ga prebere in odgovori na vprašanja. Cilj je kritično obravnavati avtentičen članek, ugotoviti pomanjkljivosti ter predlagati način, kako bi jih lahko odpravili.

1. Podatki o članku:
 - naslov članka;
 - avtorji članka;
 - revija, v kateri je članek objavljen;
 - leto objave.
2. Namen članka
3. Izbira živalske vrste glede na:
 - fiziološke in anatomske značilnosti,
 - pomembnost mikrobiološkega statusa živali za dobljene rezultate,
 - pomembnost genetskega statusa za pridobljene rezultate,
 - izvor živali,
 - vpliv spola na pridobljene rezultate,
 - vpliv okolja na pridobljene rezultate.
4. Število živali
 - Ali je bilo število živali preveliko, premajhno ali je zadoščalo kriterijem?
5. Eksperimentalne skupine
 - Ali je bilo število skupin primerno?
 - Ali je bilo upoštevano načelo 3R?
 - Ali je bila velikost vsake skupine primerna?
 - Ali je obstajala negativna kontrola?
 - Ali je obstajala pozitivna kontrola?
6. Izbira živalskega modela
 - Ali so opredelili, zakaj so izbrali ta model?
 - Ali je bil model v podobnih raziskavah uporabljen že prej?
 - Ali je bil potreben preliminarni poskus?

7. Prehrana živali

- Ali so bile živali krmljene *ad libitum* ali restriktivno?
- Kakšno krmo in vodo so uporabili?
- Kakšna je bila količina krme in vode?

8. Pogoji, v katerih so bile živali nastanjene

- Kletka/prostor in kakšna je bila velikost?
- Ali so bile živali nastanjene posamezno ali skupaj?
- Ali so bile živali označene in na kakšen način?
- Kakšni sta bili temperatura in vlaga v prostoru?
- Kakšna sta bila njihova stelja in obogatitev prostora?
- Ali so bile živali v karanteni? Kako dolgo so se aklimatizirale pred poskusom?
- Kakšen režim osvetlitve so imele?

9. Na kratko opišite načrt poskusa in bodite pozorni na spodaj naštet.

- Ali so živalim jemali kri – na kakšen način, kakšno količino in kolikokrat?
- Ali so na živalih opravljali kirurški poseg – kakšen?
- Kakšne so bile analgezija, splošna/lokalna anestezija, postoperativna nega?
- Ali so živalim aplicirali kakšne zdravilne učinkovine – katere, kam, na kakšen način, koliko?
- Ali so živalim odvzeli tkiva – kaj, koliko?
- Kakšna je bila usoda živali – evtanazija (metoda)?
- Ali so *postmortem* odvzeli kakšna tkiva – kaj, koliko?

10. Statistična obdelava podatkov

- Katere parametre so statistično preiskovali?
- Katere metode so uporabili?

11. Potencialna nevarnost za delavce:

- zoonoze,
- alergije,
- poškodbe.

12. Komentar članka