

# UTJECAJ PREHRANE I DRŽANJA ŽIVOTINJA NA REZULTATE ISTRAŽIVANJA

---

Vondra, Stela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:152933>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Stela Vondra

UTJECAJ PREHRANE I DRŽANJA ŽIVOTINJA NA REZULTATE  
ISTRAŽIVANJA

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Zavod za higijenu, ponašanje i dobrobit životinja

Predstojnik:

izv. prof. dr. sc. Mario Ostović

Zavod za prehranu i dijetetiku životinja

Predstojnica:

doc. dr. sc. Diana Brozić

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Gordana Gregurić Gračner

prof. sr. sc. Tomislav Mašek

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Kristina Starčević
2. izv. prof. dr. sc. Gordana Gregurić Gračner
3. prof. sr. sc. Tomislav Mašek
4. prof. dr. sc. Damjan Gračner

## ZAHVALE

*Zahvaljujem se mentorima izv. prof. dr. sc. Gordani Gregurić Gračner i prof. dr. sc. Tomislavu Mašek na pomoći, uloženom vremenu i strpljenju pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci i prijateljicama što su mi uljepšale sve godine studija.*

## POPIS PRILOGA

Slika 1. Tipično zubalo glodavaca (Izvor: <a href="https://www.wikiwand.com/sh/Glodavci">https://www.wikiwand.com/sh/Glodavci</a> ).....	9
Slika 2. Sklonost miševa glodanju stranih predmeta (Izvor: <a href="https://bestlifeonline.com/mice-electrical-fires/">https://bestlifeonline.com/mice-electrical-fires/</a> ) .....	11
Slika 3. Hranjenje miša u prirodi (Izvor: <a href="https://www.homestratosphere.com/types-of-mice/">https://www.homestratosphere.com/types-of-mice/</a> ) .....	13
Slika 4. Hranjenje pokusne životinje sondom (Izvor: <a href="https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/rodentadministration.pdf">https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/rodentadministration.pdf</a> ) .....	17
Slika 5. Sklonost miševa kopanju jazbina (Izvor: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Mouse-exhibiting-burrowing-behaviour-moving-forwards-in-the-cage-with-his-nose-immersed_fig4_259651878">https://www.researchgate.net/figure/Mouse-exhibiting-burrowing-behaviour-moving-forwards-in-the-cage-with-his-nose-immersed_fig4_259651878</a> ).....	18
Slika 6. Ringatil kod štakora (Izvor: <a href="https://www.humane-endpoints.info/en/rat/physical-factors">https://www.humane-endpoints.info/en/rat/physical-factors</a> ) .....	20
Graf 1. Koncentracija glukoze u krvi (A, C) i inzulina u plazmi (B, D) poslije kontroliranog obroka i obroka s visokim udjelom masti (Izvor: <a href="https://www.pnas.org/content/96/26/14843">https://www.pnas.org/content/96/26/14843</a> ) .....	14
Graf 2. Aktivnost glodavaca na kotaču za trčanje prema cirkadijalnom i „free running ritmu“ (Izvor: <a href="https://www.jove.com/t/50186/recording-analysis-circadian-rhythms-running-wheel-activity">https://www.jove.com/t/50186/recording-analysis-circadian-rhythms-running-wheel-activity</a> ) .....	23
Graf 3. Koncentracija melatonina ženke štakora u razdoblju od 12 h mraka i 12 h svjetlosti (Izvor: <a href="https://www.researchgate.net/publication/259386582_Effect_of_Spectral_Transmittance_through_Red-Tinted_Rodent_Cages_on_Circadian_Metabolism_and_Physiology_in_Nud">https://www.researchgate.net/publication/259386582_Effect_of_Spectral_Transmittance_through_Red-Tinted_Rodent_Cages_on_Circadian_Metabolism_and_Physiology_in_Nud</a> ) .....	23
Tablica 1. Propisane veličine kaveza za miševe prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta (Izvor: <a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&amp;from=en">https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&amp;from=en</a> ) .....	19
Tablica 2. Propisane veličine kaveza za štakore prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta (Izvor: <a href="https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&amp;from=en">https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&amp;from=en</a> ) .....	21



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	7
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	9
2. 1. Specifičnosti probavnog sustava, probave i prehrane glodavaca.....	9
2. 1. 1. Miševi.....	10
2. 1. 2. Štakori.....	11
2. 1. 3. Utjecaj fitoestrogena na rezultate istraživanja.....	12
2. 1. 4. Utjecaj načina hranjenja na rezultate istraživanja .....	13
2. 1. 4. 1. Hranjenje u prirodnom okolišu .....	13
2. 1. 4. 2. Hranjenje u obrocima.....	14
2. 1. 4. 3. Hranjenje ad libitum i dugoročna restriktivna hranidba .....	15
2. 1. 4. 4. Kratkoročno uskraćivanje hrane .....	16
2. 1. 4. 5. Prisilno hranjenje .....	16
2. 2. Držanje glodavaca .....	17
2. 2. 1. Miševi.....	17
2. 2. 2. Štakori.....	20
2. 2. 3. Utjecaj poremećenog cirkadijalnog ritma u glodavaca na rezultate istraživanja.....	22
2. 2. 3. 1. Utjecaj poremećaja cirkadijalnog ritma na ponašanje glodavaca .....	22
2. 2. 3. 2. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na fiziološke procese u organizmu .....	22
2. 2. 3. 2. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na metabolizam glodavaca.....	24
2. 2. 3. 4. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na imunosti sustav .....	24
2. 2. 3. 5. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na pojavnost tumora.....	25
2. 2. 4. „Sretna“ životinja vs. rezultati pokusa.....	25
2. 2. 5. Utjecaj nekih čimbenika okoline glodavaca na rezultate pokusa .....	26
2. 2. 6. Utjecaji odabranih fizičkih čimbenika okoliša glodavaca na rezultate pokusa .....	27
3. RASPRAVA .....	28
4. ZAKLJUČCI.....	31
5. LITERATURA .....	32
6. SAŽETAK .....	39
7. SUMMARY.....	40

8. ŽIVOTOPIS.....	41
-------------------	----



## 1. UVOD

Laboratorijske životinje su pokusne životinje koje se uzgajaju u svrhu korištenja u pokusima ili u znanstvene ili obrazovne svrhe te za rad na izoliranim organima, tkivima i trupovima u tu svrhu usmrćenih životinja i za proizvodnju bioloških pripravaka, i to: miš (*Mus musculus*), štakor (*Rattus norvegicus*), zamorčić (*Cavia porcellus*), zlatni hrčak (*Mesocricetus auratus*), kineski hrčak (*Cricetulus griseus*), mongolski skakač (*Meriones unguiculatus*), kunić (*Oryctolagus cuniculus*), pas (*Canis familiaris*), mačka (*Felis catus*), sve vrste primata koji ne uključuju čovjeka, žaba *Xenopus (laevis, tropicalis)* i Rana (*temporaria, pipens*) i zebrića (*Danio rerio*) (Zakon o zaštiti životinja, NN107/2017).

U ovom diplomskom radu razmatraju se osnovni postulati u prehrani i držanju najčešće korištenih laboratorijskih životinja – miševa i štakora.

Hranidba je znanost koja proučava hranu za životinje te njihove hranidbene potrebe, proizvodnost i zdravlje. Kod svih životinja hranidba je najznačajniji vanjski čimbenik u uspješnom uzgoju (Mašek i Brozić, 2019.).

Usklađivanje standardizacije istraživanja (ponovljivosti rezultata i smanjenje varijabilnosti) s dobrobiti (način na koji se životinja nosi s okolišem) najčešći je problem hranidbe kod pokusnih životinja. Tijekom istraživanja glodavce se najčešće hrani bez ograničenja, iz praktičnih razloga, no postoji veliki broj istraživanja o štetnom učinku takvog načina hranjenja (npr. debljanje, bolesti srca, povećana pojavnost tumora). S obzirom da takav način hranjenja nema nikakve sličnosti s hranjenjem u prirodnim uvjetima, pitanje je je li baš u skladu s dobrobiti. Međutim, život glodavaca u prirodi isto tako nije potpuno u skladu s dobrobiti budući da životinje ne mogu uvijek zadovoljiti svoje prehrambene potrebe hranom dostatnom u količini i kvaliteti, te da su izložene predatorima (Mašek i Brozić, 2019.).

Laboratorijske životinje nemaju mogućnost izmaknuti nepovoljnim uvjetima smještaja i držanja, na primjer, kako bi pronašle hranu i vodu ili povoljnije mjesto za razmnožavanje. Sve njihove fiziološke i etološke potrebe moraju biti zadovoljene u laboratoriju, odnosno, primarnom smještajnom objektu (kavez). Te potrebe moraju biti zadovoljene ili će ugroziti zdravlje životinje (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.). Nužno je primjenjivati načelo pet sloboda koji između ostalih štiti i dobrobit laboratorijskih životinja. Sloboda od gladi i žeđi podrazumijeva da životinji mora biti

dostupna optimalna prehrana kako bi osigurale rast, reprodukciju i dugovječnost. Sloboda od neudobnosti znači da životinja mora imati prikladno sklonište i okolišnu temperaturu te udobno mjesto za odmaranje. Sloboda od boli, ozljeda i bolesti podrazumijeva sprečavanje pojave te pravodobnu dijagnostiku i liječenje bolesti i ozljeda. Sloboda od straha, stresa i tjeskobe znači da uvjeti života ne smiju uzrokovati mentalnu patnju. I na kraju, sloboda očitovanja ponašanja svojstvenog vrsti znači da životinji mora biti osiguran prostor koji dopušta normalno kretanje bez prenapučenosti te društveni kontakt (Elicher, 2019.).

Smještaj životinje u kvalitetnim uvjetima rezultirat će vjerodostojnijim rezultatima u raznim istraživanjima i testiranjima. U toksikologiji, staro uvjerenje da je najbolji način da rezultati budu standardizirani držati životinje u oskudnim uvjetima više je puta osporavan u znanstvenoj literaturi radi toga što stres i anksioznost nastali zbog neprikladnog smještaja utječu na životinje pa tako i na rezultate i to na nepredvidive načine (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

Nadalje, Russel i Brunch su 1959. godine u svojoj knjizi „Načela humanih pokusnih tehnika“ postavili temelje znanstvene discipline koja treba poboljšati postupke u radu s laboratorijskim životinjama te pridonijeti kvaliteti istraživanja u kojima se te životinje koriste. Pravila kojima bi se mogli isključiti nečovječni postupci prema životinjama u pokusu rezultirala je stvaranjem 3R načela: *Raplacement* (zamjena), *Reduction* (smanjenje) i *Refinement* (poboljšanje) (Bubić Špoljar i sur., 2019.).

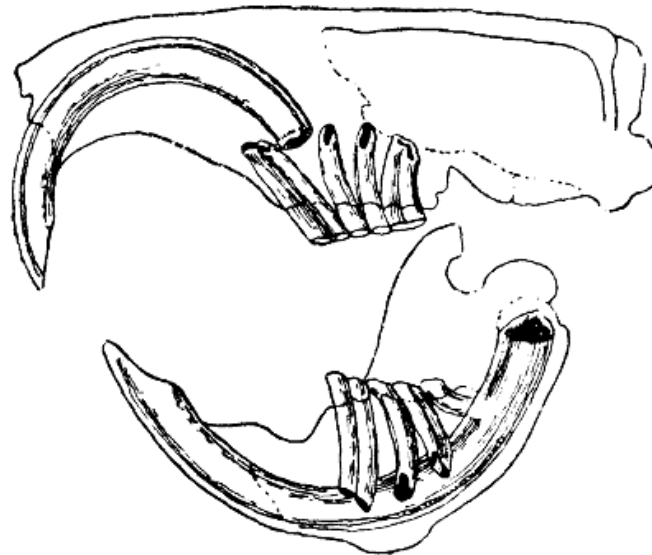
*Zamjena* podrazumijeva korištenje modela koji „ne osjećaju“ u znanstvenim istraživanjima umjesto živih kralježnjaka koji su sposobni „osjećati“. *Smanjenje* implicira na redukciju broja životinja u pokusu, do broja koji je neophodan za postizanje preciznih rezultata. *Poboljšanje* obuhvaća smanjenje pojavljivanja nečovječnih postupaka nad onim životinjama koje će se, nakon primjene prva dva načela, ipak koristiti. (Bubić Špoljar i sur., 2019.).

3R načela razvijala su se tijekom proteklih pedeset godina te su osigurala okvir za humano izvođenje pokusnih postupaka nad životinjama. Postupno su postala dijelom nacionalnih zakonodavstava koja se odnose na korištenje pokusnih životinja u znanstvenim organizacijama ili organizacijama koje novčano podupiru istraživanja na životinjama (Bubić Špoljar i sur., 2019.). Kako bi se učinkovito nadziralo korištenje životinja u pokusima s ciljem osiguravanja njihove dobrobiti, do danas su objavljene brojne upute i zacrtavani okviri za postupanje, a većina ih se oslanjala upravo na 3R pravilo (Bubić Špoljar i sur., 2019.).

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2. 1. Specifičnosti probavnog sustava, probave i prehrane glodavaca

Glodavci (*Rodentia*) su karakteristični po svojoj strukturi zubiju. Imaju 16 ili 20 zubi te se u svakoj polovici čeljusti nalazi po jedan sjekutić (*Dens incisivus*) koji se naziva zubom glodavcem. Iza sjekutića se nalazi prazan prostor – *Diastema*. Donji sjekutići najčešće su duži od gornjih, a očnjaci nisu razvijeni. Uglavnom imaju samo trajne zube, od rođenja. Iznimka su vrste iz nadporodice *Cavioidea* koje imaju i mliječne zube, ali ih trajni zubi zamjenjuju još prije rođenja. Zubi glodavaca nemaju korijen već tijekom cijelog života rastu iz zubne šupljine (Spratt, 2018.).



Slika 1. Tipično zubalo glodavaca (Izvor: <https://www.wikiwand.com/sh/Glodavci>)

Glodavci imaju jednostavan želudac, sa žljezdanim i nežljezdanim dijelom te ne mogu povraćati. Nabor na mišićnom tkivu u ezofagogastričnom spoju tvori fizičku barijeru za koju glodavci nemaju dovoljnu jaku jednjačku muskulaturu da bi je mogli nadvladati. Također, imaju manjak sposobnosti da koordiniraju različite mišiće potrebne za povraćanje. Glodavci, kao i ostali biljožderi imaju mikrobnu fermentacijsku komoru potrebnu za probavu celuloze iz biljaka (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.). Strategija glodavaca, suprotno preživačima, je omogućiti što brži prolaz hrane kroz probavni sustav kako bi se potaknuo količinom značajniji i češći unos (Björnhag, 1987.). Većina glodavaca je koprofag odn. jede vlastiti feces pri čemu vitamini i aminokiseline koje je sintetizirala mikroflora, a nisu se apsorbirali u probavnom sustavu tako postaju dostupni. (Yarto-Jaramillo, 2015.).

Glodavci su se prilagodili hranidbi različitih namirnica; sjemenki, zrnja, korijenja, lišća i voća, beskralježnjaka te čak i malih riba (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.). U laboratoriju su najčešće hranjeni *ad libitum* prehranom baziranom na peletima žitarica, a iz hranilica koje su smještene na povišenom kako bi se izbjegla kontaminacija izmetom. Hranilice bi se trebale čistiti na tjednoj bazi, no učestalost čišćenja ovisi o mnogo faktora kao što su sustav držanja, gustoća jedinki te prisustvo tek okoćene mladunčadi.

Voda je glodavcima osim za hidrataciju potrebna i kao lubrikant hrane. Kod miševa, ukoliko dođe do insuficijencije tekućine javljaju se poteškoće s hranjenjem. Voda može biti omogućena u automatiziranim pojilicama ili bocama. Ona u bocama se kontaminira slinom i fecesom te je potrebno učestalo čišćenje. Automatizirani sustavi osiguravaju da životinje uvijek imaju dostupnu dovoljnu količinu vode. Kada su bolesni, miševi će piti jako malo vode i brzo će dehidrirati (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

### 2. 1. 1. Miševi

Za održavanje bazalnog metabolizma miševa, dnevno je potrebno oko 160 kcal za jedinke koje nemaju genetičke ili stresom izazvane abnormalnosti. Hrana može biti u peletima, u prahu ili u gelu. Prehrana za održavanje obično sadrži 4 do 5% masti, 12 do 14% proteina, a za rast i reprodukciju 7 do 11% masti i 12 do 14% proteina (Cheetham i sur., 2009.). Dnevno je potrebno približno 5 do 8 ml vode i 4 do 8 g suhe mase po jedinki (Hedrich i sur., 2004.). Međutim, na unos hrane i vode utječe temperatura okoliša pa tako povećanje temperature na 29 do 33°C značajno smanjuje konzumaciju (Overton i Williams, 2004.). S druge strane, prekomjerna konzumacija može dovesti do pretilosti te povećane pojavnosti tumora (Fawcett, 2012.). Poslastice, koje se koriste za obogaćivanje okoliša ili radi motivacije životinje, također treba uzeti u obzir kod procjene ukupne prehrane (Rowland, 2007.).

Osim okolišne temperature, konzumacija hrane i vode su pod utjecajem društvenog okruženja, ciklusa svjetlosti i mraka te položaja kaveza na polici. Fiziologija organizma također može imati veliki utjecaj. Naime, jedinke u laktaciji ili tijekom graviditeta konzumiraju povećanu količinu hrane (Rowland, 2007.). Također, miševi mogu i odbiti novu vrstu hrane kada im se ponudi prvi put (File, 2001.).

Jedinke lociraju hranu njuškanjem. Hranu obično uzimaju u usta, pomaknu se na željeno mjesto te manipuliraju hranom prednjim šapama (Fawcett, 2012.).

Kao i svi glodavci i miševi imaju snažnu potrebu za glodanjem. Takvo ponašanje nije ograničeno na hranu te se može odnositi i na predmete do kojih mogu doći kroz rešetke kaveza što može rezultirati oštećenjem sjekutića ili drugim materijalnim štetama (Pujo, 2021.; Bradley Bay, 2006.).



Slika 2. Sklonost miševa glodanju stranih predmeta (Izvor: <https://bestlifeonline.com/mice-electrical-fires/>)

### 2. 1. 2. Štakori

Štakori se mogu u cijelosti hraniti *ad libitum* peletima koji sadrže 20 do 27% proteina i 5% masti, dok veća količina proteina može smanjiti reproduktivnu učinkovitost (Koolhaas, 2010.). Štakori su oprezni pri hranjenju te će odbiti konzumirati hranu koja im je nepoznata. Davanje samih namirnica unutar kaveza, a ne u fiksiranim dozatorima, može potaknuti konzumaciju i omogućiti štakorima zauzimanje normalnog položaja za hranjenje (Animal Research Review, 2007.). Hrane se noću (Siegel 1961.) te, kao i miševi, hranu prvo uzimaju u usta, a potom pronalaze mjesto za hranjenje (Lawlor, 2002.). Potrebno im je 5 do 10 g hrane na 100 g tjelesne mase dnevno. Mladi i odrasli za održavanje bazalnog metabolizma pojedu 15 g dnevno, ženke u graviditetu 15 do 20 g dnevno te 40 do 30 g hrane u laktaciji. Kod starijih jedinki povoljne učinke može imati smanjivanje hrane na 80% od unosa pri *ad libitum* hranjenju. To može produljiti njihov životni vijek i smanjiti mogućnost nastanka neoplazija (Koolhaas, 2010.). Hrana i voda

ne smiju biti kontaminirani te je, ukoliko je moguće, potrebno mijenjati vrstu hrane (Newberne, 1975.).

### 2. 1. 3. Utjecaj fitoestrogena na rezultate istraživanja

Studije su pokazale da se fitoestrogeni daidzein i genistein nalaze u hrani glodavaca u dovoljnoj količini da uzrokuju promjene *in vivo* na krajnje djelovanje hormona i uzrokuju promjene rezultata studija koje su istraživale estrogenu, reproduktivnu ili karcinogenu aktivnost različitih komponenti (Boettger-Tong i sur, 1998.).

Većina studija koja je uključivala fitoestrogene otkrila je njihovo dobro djelovanje na zdravlje ljudi. No manje je pozornosti bilo posvećeno učincima prehrane fitoestrogenima na kancerogeno djelovanje na laboratorijske životinje. Studije na životinjama kasnije su pokazale da konzumacijom soje dolazi do smanjene incidencije razvoja tumora. Ti učinci fitoestrogena mogli bi biti povezani sa sposobnošću fitoestrogena da se ponašaju kao anti-estrogeni. Mehanizam djelovanja nije potpuno razjašnjen, ali se vjeruje da uključuje hormonalnu i nehormonalnu aktivnost izoflavona (Thigpen i sur., 1999.).

Hranjenje miševa s prehranom koja sadrži 30% soje štiti jetru od razvoja karcinoma induciranog prekursorima nitrozamina, dibutilaminom i nitritom (Fitzsimmons i sur. 1989.). Štakori koji su konzumirali prehranu baziranu na soji razvili su 40% manje tumora mliječne žlijezde nakon aplikacije kancerogena u odnosu na štakore koji nisu hranjeni sojom (Barnes i sur., 1990.). Također, tek okoćeni štakori kojima je apliciran genistein, a zatim kada su sazreli i dimetilbenz-antracen kako bi inducirao kancerogenezu mliječne žlijezde, imali su značajno smanjenu latenciju razvoja tumora kao i smanjenu pojavnost istih (Lamartiniere, 1995.).

Kod Lobund Wistar štakora hranjenih visokom razinom izoflavona uočena je manja pojavnost induciranog raka prostate u odnosu na štakore hranjene istom hranom s manjom količinom izoflavona (Pollard i Luckert, 1997.).

Fitoestrogeni se mogu ponašati i kao antioksidansi. Hepatokarcinogeneza je u ženki štakora inducirana primjenom dietlinitrozamina i fenobarbitala. Konzumacijom izoflavona iz soje normalizirala se aktivnost jetrene glutation-peroksidaze – antioksidantnog enzima potisnutog fenobarbitalom (Lee i sur., 1995.).

Nedavno je otkriveno da je prehrana glodavca koja sadrži visoke količine diadzeina (14 mg/kg) i geinsteina (210 mg/kg) dovela do gotovo maksimalnog uterotropnog odgovora i ovariektomirala 30 dana stare Sprague Dawley štakore te utjecala na njihovu normalnu reakciju pri primjeni estradiola. Poznato je da se fitoestrogeni, u malim ili velikim količinama, mogu kompetitivno vezati za receptore estrogena u uterusu, stoga imaju potencijal značajno utjecati na rezultate istraživanja koja uključuju primjenu egzogenih estrogena (Setchell and Adlercreutu, 1988.).

#### 2. 1. 4. Utjecaj načina hranjenja na rezultate istraživanja

##### 2. 1. 4. 1. Hranjenje u prirodnom okolišu

Živi su organizmi u prirodi neprestance pod utjecajem vanjskih podražaja kod kojih mnogi imaju pravilne ili ritmičke uzorke, to su npr. mjesečeve mijene, noć i dan, godišnja doba te godišnji obrasci svjetlosti, temperature, dostupnost hrane i tako dalje. S obzirom da su takve promjene u prirodi obično predvidljive, životinje im se mogu fiziološki prilagoditi. Sposobnost predviđanja nekih prirodnih događaja od velike je važnosti za preživljavanje stoga može biti povezana s činjenicom da sposobnost predviđanja i kontrole često ima učinak na smanjenja stresa kod životinja (Moraal i sur., 2012.).



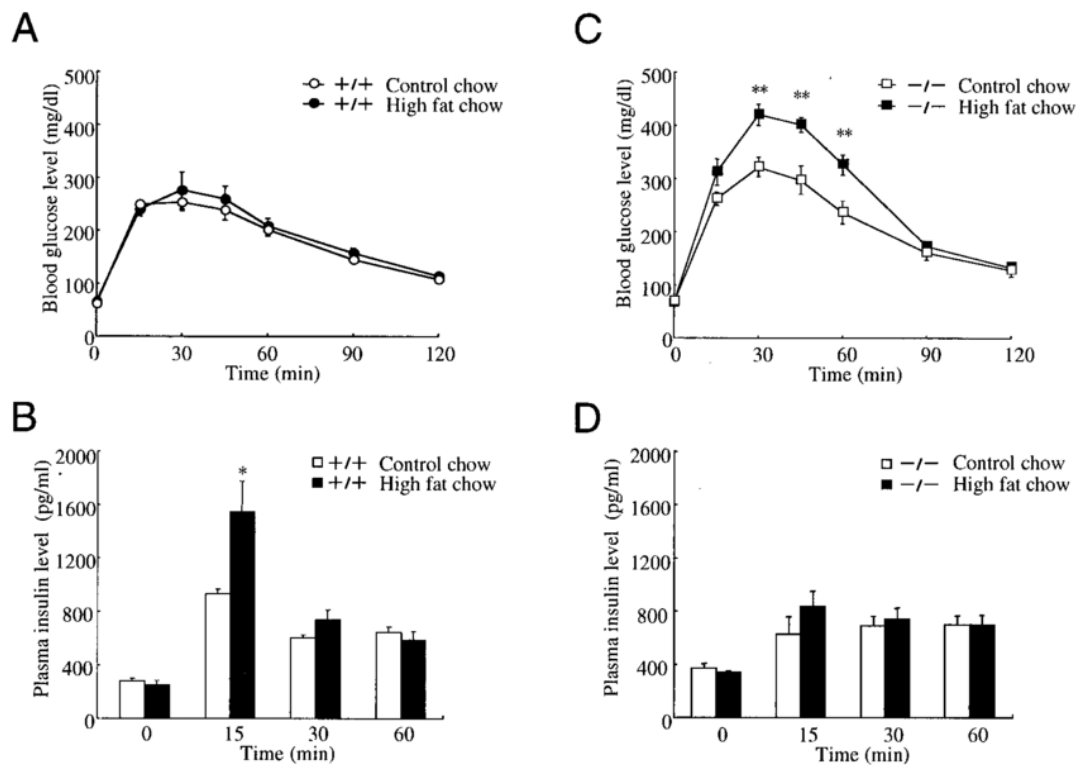
Slika 3. Hranjenje miša u prirodi

(Izvor: <https://www.homestratosphere.com/types-of-mice/>)

## 2. 1. 4. 2. Hranjenje u obrocima

Premda se rasporedi hranjenja koriste za povećanje standardizacije pokusa, uglavnom su prilično neprirodni. Takvi rasporedi ometaju prirodne ritmove pijenja, hranjenja i spavanja (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

Poremećaji se pojavljuju i u ritmovima fizioloških procesa, a koji su povezani s hranom. Očiti primjer je povećanje koncentracije glukoze te aktivnosti metabolizma za vrijeme i poslije jela. Učinci su veći što je pojedena količina hrane tijekom obroka veća (Hart i sur., 1995.).



Graf 1. Koncentracija glukoze u krvi (A, C) i inzulina u plazmi (B, D) poslije kontroliranog obroka i obroka s visokim udjelom masti (Izvor: <https://www.pnas.org/content/96/26/14843>)

Također, gotovo svaka probavna ili metabolička varijabla mijenja se ukoliko životinja očekuje obrok. Ovakve promjene nazivaju se cefaličnim odgovorima jer su mnoge od njih pokrenute signalima iz mozga. Ipak, kada se šest jednakih obroka s jednakim intervalima rasporedi tijekom dnevnog ciklusa, ovakvi odgovori se ne javljaju (Strubbe i Woods, 2004.). No tamo gdje istraživanje zahtijeva raspored hranjenja od jednog ili dva obroka dnevno, cefalični odgovori učestala su pojava. Svakako je poželjnije hraniti životinje češće u manjim obrocima jer štakori obično pojedu osam do deset obroka



dnevno. Dobrobit životinja svakako je narušena prisilnim umjetnim rasporedom hranjenja (Strubbe, 1992.).

#### 2. 1. 4. 3. Hranjenje *ad libitum* i dugoročna restriktivna hranidba

Glodavci se hrane *ad libitum* u većini eksperimentalnih studija. Ono može biti privlačno iz praktičnih razloga – jer ne postoji poseban sustav hranjenja niti je potrebno previše brige o hrani. Međutim, na temelju rezultata toksikoloških studija, takav je način hranjenja upitan ako uzmemo u obzir i znanstveni aspekt i dobrobit životinje. Dugoročno *ad libitum* hranjenje ima negativne posljedice na zdravlje u odnosu na restriktivno hranjenje (75% unosa *ad libitum*). To uključuje kraći životni vijek, veće stope pretilosti, razvoj degenerativnih bolesti bubrega i srca te pojavu tumora u mlađoj dobi (Hart i Turturro, 1997.). Potvrđeno je da životinje postaju izdržljivije kada je unos hrane ograničen, odnosno, bolje se nose sa stresorima tijekom pokusa i postupcima povezanim s pokusom (Keenan i sur., 1999.).

U većini slučajeva, prekomjerna težina ne smatra se zdravstvenim problemom jer laboratorijske životinje ne dožive dob u kojoj se tegobe pojavljuju. Ipak, za istraživanja fiziologije starenja i bubrega postoje jasni razlozi za korištenje restriktivne prehrane umjesto *ad libitum* hranjenja (Keenan i sur., 1999.).

Keenan i sur. (1999) su pokazali da je *ad libitum* hranjenje najmanje kontrolirani čimbenik koji utječe na pokus u laboratorijskim istraživanjima. Znatna odstupanja u rezultatima pokusa na glodavcima pri *ad libitum* hranjenju uočena su u razdoblju od 1980. do 1990., u nekim toksikološkim pokusima (Keenan i sur., 1999.). Uzrok tome mogao bi biti kontinuirani odabir brže rastućih nesrodnih jedinki jer se brz rast često smatrao pokazateljem dobrog zdravlja i izdržljivosti koji vode k boljoj reprodukciji. No brži bi se rast zapravo mogao povezati s kraćim životnim vijekom. Kod *ad libitum* hranjenja, tjelesna masnoća može biti veća od 25%. Kod ograničavanja unosa hrane na 85% *ad libitum* unosa, masnoća će biti manja od 10% što je ekvivalentno postotku masti kod životinja u prirodi (Moraal i sur., 2012.).

Pri *ad libitum* hranjenju životinje mogu proizvoljno birati količinu hrane koju će konzumirati. No po definiciji, kod istraživanja gdje su životinje hranjene fiksno određenom količinom hrane standardizacija eksperimenta automatski se poboljšava. Prilikom testiranja kloral hidrata u štakorima *ad libitum*, odnosno hranidbeno ograničenim uvjetima, utvrđeno je da do značajne razlike u aktivnosti jetrenog enzima laurinske kiseline između kontrolne i testne skupine dolazi pri dozi od 100 mg/kg. U

skupini sa slobodnim uvjetima bilo je potrebno 86, a u hranidbeno ograničenoj skupini samo 7 životinja za dokazivanje statistički značajne razlike. (Leakey i sur., 2003.).

To pokazuje da je smanjenje broja korištenih životinja bilo moguće za 92% jer je učinak kloral hidrata mnogo značajniji u hranidbeno ograničenim (u usporedbi s *ad libitum*) uvjetima (Hart i sur. 1995.). Međutim, osim broja jedinki razmotriti se trebaju i problemi dobrobiti kod restriktivnog hranjenja. Dugotrajno ograničenje hrane može izazvati osjećaj gladi. To može biti snažan stresor koji dovodi do abnormalnog ponašanja kao što su stereotipije čime je narušena sama dobrobit životinje (Dixon i sur., 2003.).

#### 2. 1. 4. 4. *Kratkoročno uskraćivanje hrane*

Kratkoročno uskraćivanje hrane kao što je noćni post, često se koristi u istraživanjima. Primjerice, takav post može biti neophodan kada uzorci krvi trebaju biti slobodni od masti za određene analize. Ovakvi kratki periodi restrikcije hrane su potrebni za određene pokuse te mogu poboljšati standardizaciju i ponovljivost eksperimenata. Međutim, uskraćivanje hrane u periodu od 24 sata u odnosu na *ad libitum* prehranu u različitim životinja rezultira različitim metaboličkim odgovorom životinje (Strubbe i sur., 1986.). Nakon što je štakorima hrana oduzimana 24 sata ili dulje korištene su sve zalihe glikogena. Uskraćivanje hrane štakorima u razdoblju od 12 sati dovodi do pomaka od metabolizma ugljikohidrata u metabolizam masti (Strubbe i sur., 1986.).

#### 2. 1. 4. 5. *Prisilno hranjenje*

U farmaceutskim i nutricionističkim istraživanjima, životinja je hranu lošeg okusa spremna odbiti. U takvim se slučajevima koristi prisilno hranjenje. Prisilno se hranjenje može koristiti kod primjene radioaktivnih izotopa ili imunosupresiva gdje je potrebno precizno doziranje jer tvari štetne za zdravlje ne smiju završiti u okolišu. Međutim, aplikacija obroka izravno u želudac u usporedbi s dobrovoljnom konzumacijom sličnog obroka može utjecati na rezultate pokusa (Vachon i sur., 1988.). U ovom istraživanju Vachona i sur., dobrovoljna konzumacija hrane dala je rezultate sličnije onima iz istraživanja provedenih na ljudima. Nedostatak želučane sonde je što zaobilazi sve orofaringealne procese, uključujući fizičke učinke žvakanja i dodavanja enzima sline koji pokreću probavu. Prisilno hranjenje također može uzrokovati stres kod životinja što rezultira suzbijanjem gastrointestinalne aktivnosti. Međutim, ponavljanjem procesa životinje se mogu naviknuti na postupak, a nagrađivanjem ublažiti negativni učinci

prisilnog hranjenja te korištenje želučane cijevi postupno postaje manje stresno (Vachon i sur., 1988.).



Slika 4. Hranjenje pokusne životinje sondom  
(Izvor: <https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/rodentadministration.pdf>)

## 2. 2. Držanje glodavaca

Glodavci se najčešće drže u ograđenim jedinicama s nadziranom zdravstvenim statusom. Kavezi su najčešće plastični, oblika kutije za cipele. Trebaju imati čvrsto dno, obogaćen okoliš, mjesto za koćenje i spavanje te skrovište. Većina jedinki je društvena i mogu biti držane u grupama kompatibilnih životinja, no odrasli mužjaci miševa mogu pokazivati agresiju te su ponekad smješteni pojedinačno. Ženke svih vrsta će braniti svoju mladunčad i najbolje ju je odvojiti za vrijeme koćenja (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

Prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta, glodavce treba držati na temperaturi između 20 i 24°C. Vlažnost zraka treba biti između 45 i 65%, a preporučena duljina svjetlosnog dana je 12 sati. Osvjetljenost treba ograničiti 350 na 400 luksa osim za albino životinje. Intenzitet osvjetljenosti za albino glodavce kreće se oko 60 luksa. Osvjetljenje prejakog intenziteta može uzrokovati oštećenje retine. S obzirom da glodavci mogu čuti ultrazvuk (divlji miš može čuti do 92 kHz), treba nadzirati i smanjiti emitiranje visokih frekvencija u objektima: Naime, proizvodi ih različita oprema i brojne svakodnevne (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

### 2. 2. 1. Miševi

Prostor za život miševa mora biti dovoljno velik da može zadovoljiti sve njihove fiziološke i etološke potrebe uključujući potrebu za hranom i vodom, igranjem, traženjem

hrane, istraživanjem, glodanjem, skrivanjem, koćenjem, različitim društvenim aktivnostima, mokrenjem i defeciranjem (Fawcett, 2012.). Na primjer, miševi se radije kote dalje od prostora u kojima uriniraju i defeciraju. Međutim, uobičajeno držanje laboratorijskih miševa u kavezima ne omogućava miševima da prostorno odvoje svoje dnevne aktivnosti čime se negativno utječe na njihovu dobrobit (Makowska i sur., 2019.).

Za povećanje kompleksnosti kaveza mogu se koristiti razdjelnici. Korištenje horizontalnih i vertikalnih pregrada može povećati životni prostor, oponašati prirodni okoliš, utjecati na povećanje aktivnosti životinje te prividno smanjiti gustoću jedinki u kavezu. Također, takve pregrade smanjuju stres i osjetljivost miševa (Chamove, 1989.).

Što se tiče fizičkih kretnji, miševi se moraju moći slobodno okretati bez izvijanja glave i tijela, hodati barem nekoliko koraka, stajati na stražnjim nogama i istežati se. Također, trebaju imati mjesto za skloniti se i odmoriti. Međutim, to ne znači da je veći kavez nužno i bolji. Miševi su skloni tigmotaksiji te na povećanje prostora ne reagiraju kao ostale vrste (Fawcett, 2012.). Sami kavezi moraju biti izrađeni od materijala koji ne upijaju i nisu toksični te ih se može čistiti (autoklavirati) (Animal Research Review, 2007.). O materijalu od kojeg je izrađen kavez mogu ovisiti i mikroklimatski uvjeti unutar njega jer taj materijal može utjecati na prodor svjetlosti i topline.

Miševi imaju jaku potrebu za kopanjem jazbina te ta potreba postoji čak i u prisutnosti već prethodno izgrađenog sustava jazbina ili skrovišta te će mladi miševi radije spavati u samoj stelji nego u prethodno izgrađenim skrovištima (Sherwin i sur., 2004.).



Slika 5. Sklonost miševa kopanju jazbina

(Izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Mouse-exhibiting-burrowing-behaviour-moving-forwards-in-the-cage-with-his-nose-immersed\\_fig4\\_259651878](https://www.researchgate.net/figure/Mouse-exhibiting-burrowing-behaviour-moving-forwards-in-the-cage-with-his-nose-immersed_fig4_259651878))

Uvjeti držanja i uzgoja mogu imati veliki utjecaj na laboratorijske miševe tijekom njihovog života. Fizički okoliš i društvena okolina miševa ima značajan utjecaj na njihovu

dobrobit pa tako i na kvalitetu istraživanja u kojima ih se koristi kao pokusne modele. Uvjeti koji nisu u skladu sa standardima mogu dovesti do abnormalnih ponašanja kao što su povećana agresivnost i stereotipije (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

Tablica 1. Propisane veličine kaveza za miševe prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta

(Izvor: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=en>)

	Tjelesna težina (g)	Najmanja veličina kaveza (cm <sup>2</sup> )	Podna površina po životinji (cm <sup>2</sup> )	Najmanja visina kaveza (cm)	Datum iz članka 33. stavka 2.
U zalihama i tijekom postupaka	do 20	330	60	12	1. siječnja 2017.
	od 20 do 25	330	70	12	
	od 25 do 30	330	80	12	
	iznad 30	330	100	12	
Uzgoj		330 Za monogamni par (nesrodstveno parenje/srodstveno parenje) ili trio (srodstveno parenje). Za svaku dodatnu ženku s leglom potrebno je dodati 180 cm <sup>2</sup> .		12	
U zalihama kod uzgajivača (♂) Veličina kaveza 950 cm <sup>2</sup>	do 20	950	40	12	
Veličina kaveza 1 500 cm <sup>2</sup>	do 20	1 500	30	12	

Na miševe utječe i boja kaveza koja može povećati razinu anksioznosti i potaknuti ih na bijeg iz kaveza. Miševi su skloniji neprozirnim kavezima i u njima je uzgoj uspješniji, međutim, unatoč toj spoznaji uglavnom se uzgajaju u prozirnim plastičnim kavezima (Sherwin i Glen, 2003.).

Miševi su životinje koje imaju veliku površinu tijela u odnosu na njegov volumen. Zbog toga u okoliš brzo otpuštaju tjelesnu toplinu i pokazuju osjetljivost na temperaturne promjene (Ritskes-Hoitinga & Chwalibog, 2002.). Također su osjetljivi i na dehidraciju. U divljini se, na primjer, zakopavaju u jazbinu kako bi se ohladili, stoga je održavanje

pravilnih okolišnih uvjeta i pružanje uvjeta u kojima životinja može upravljati svojim mikrookolišem od velike važnosti (Ritskes-Hoitinga & Chwalibog, 2002.).

### 2. 2. 2. Štakori

Cilj dobre skrbi i držanja životinja treba biti očuvanje zdravlja životinja te zadovoljavanje njihovih fizioloških i etoloških potreba. Mogućnost upravljanja okolišnim čimbenicima kao što su okolišna temperatura, relativna vlažnost zraka i osvjetljenje u tome ima značajnu ulogu (Animal Research Review, 2007.). Na primjer, niska vlažnost zraka u štakora može uzrokovati takozvani „*ringtail*“ – kružnu leziju na repu koja može dovesti do nekroze i otpadanja repa, shodno tome vlažnost zraka ne smije biti niža ili održavana na 40% (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).



Slika 6. Ringatil kod štakora  
(Izvor: <https://www.humane-endpoints.info/en/rat/physical-factors>)

Štakorima odgovaraju pravokutni kavezi (Animal Research Review, 2007.). Jedinke pokazuju znakove stresa i neudobnosti kada su smještene u kaveze sa žičanim podom i okolišem siromašnom na podražajima. Stoga bi se, osim ako za suprotno ne postoji snažno znanstveno opravdanje, uvijek trebali držati u nastambi sa čvrstim podom (Van De Weerd i ostali, 1996.).

Stelja ne bi trebala biti prašnjava, sadržavati patogene mikroorganizme, parazite ili kemijske zagađivače. Osim toga, poželjno je da bude jeftina, lako dostupna i jednostavna za bratanje. Također, pokazalo se da štakori preferiraju stelju većih čestica (drvne strugotine) u odnosu na piljevinu. Treba je biti u dovoljnoj količini da pokrije cijeli pod. Dubina ovisi o korištenom materijalu, broju štakora u kaveza i učestalosti čišćenja, no ne bi trebala biti plića od 2 cm (Animal Research Review, 2007.).

Tablica 2. Propisane veličine kaveza za štakore prema Direktivi 2010/63/EU Europskog parlamenta (Izvor: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=en>)

	Tjelesna težina (g)	Najmanja veličina kaveza (cm <sup>2</sup> )	Podna površina po životinji (cm <sup>2</sup> )	Najmanja visina kaveza (cm)	Datum iz članka 33. stavka 2.
U zalihama i tijekom postupaka (♻️)	do 200	800	200	18	1. siječnja 2017.
	od 200 do 300	800	250	18	
	od 300 do 400	800	350	18	
	od 400 do 600	800	450	18	
	iznad 600	1 500	600	18	
Uzgoj		800 Majka i leglo. Za svaku dodatnu odraslu životinju stalno nastanjenu u kavezu potrebno je dodati 400 cm <sup>2</sup> .		18	
U zalihama kod uzgajivača (♻️) Veličina kaveza 1 500 cm <sup>2</sup>	do 50	1 500	100	18	
	od 50 do 100	1 500	125	18	
	od 100 do 150	1 500	150	18	
	od 150 do 200	1 500	175	18	
U zalihama kod uzgajivača (♻️) Veličina kaveza 2 500 cm <sup>2</sup>	do 100	2 500	100	18	
	od 100 do 150	2 500	125	18	
	od 150 do 200	2 500	150	18	

Unatoč propisanim veličinama, konvencionalni kavezi mogu dovesti do ukočenosti i stresa jer ne pružaju štakorima dovoljno mjesta za izvođenje normalnog ponašanja kao što su istežanje ili uspravno stajanje. Iz tog se razloga preporučuju nastambe viših stijenki (Makowska i Weary, 2016.).

### 2. 2. 3. Utjecaj poremećenog cirkadijalnog ritma u glodavaca na rezultate istraživanja

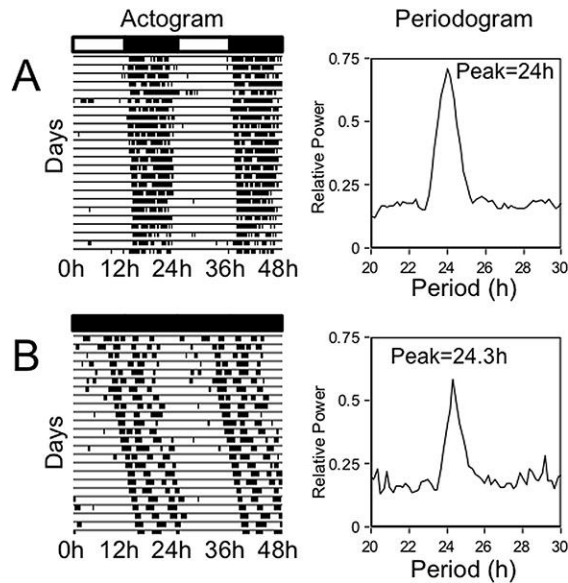
#### 2. 2. 3. 1. Utjecaj poremećaja cirkadijalnog ritma na ponašanje glodavaca

Kada životinje žive u okolišu gdje su izložene predvidljivom svjetlosnom ciklusu svakih 24 sata, njihov obrazac ponašanja se sinkronizira s tim ciklusom (Moraal i sur., 2012.). Stoga, kada su svjetlost ili tama konstantno prisutni, životinje više nisu u mogućnosti sinkronizirati se s prirodom. Rezultat toga su promjene u obrascima ponašanja, uključujući obrazac hranjenja kojim upravlja, sada ne uvježban, endogeni oscilator. On djeluje kao „*free running*“ ritam - slično, ali ne identično onomu kao pri rotaciji Zemlje. „*Free running*“ ritam ovisi o jedinki i genetski je određen, stoga u odsutnosti izmjene svjetlosti i tame, ritmovi životinja će biti u drugačijim fazama što može znatno utjecati na varijabilnost istraživanja (Moraal i sur., 2012.).

#### 2. 2. 3. 2. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na fiziološke procese u organizmu

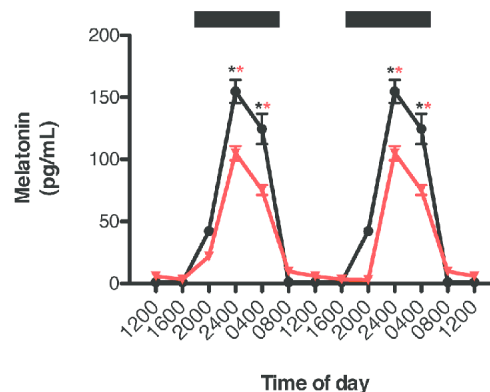
Poremećeni cirkadijalni ritam snažno utječe na fiziološke procese u organizmu kroz tri ključna mehanizma: promjenu ekspresije oscilirajućeg gena zaduženog za prepoznavanje cirkadijalnog ritma, supresiju izlučivanja hormona melatonina i stimulaciju simpatikusa. Izlaganjem laboratorijskih glodavaca svjetlosti u trajanju od samo 15 minuta za vrijeme faze mraka može se povećati bazalna ekspresija gena za prepoznavanje cirkadijalnog ritma i time intenzivirati dnevnu aktivnost životinja (Shigeyoshi i sur., 1997.).





Graf 2. Aktivnost glodavaca na kotaču za trčanje prema cirkadijalnom i „free running ritmu“ (Izvor: <https://www.jove.com/t/50186/recording-analysis-circadian-rhythms-running-wheel-activity>)

Hormon melatonin ima značajan broj fizioloških funkcija posredovanih receptorima (npr. cirkadijalna regulacija, imunosna modulacija) i neovisnih o receptorima (npr. uklanjanje slobodnih radikala, detoksikacija) (Reiter, 2009.). Promjene u razini melatonina narušavaju hormonalnu ravnotežu što se očituje kroz promijenjene razine reproduktivnih, nadbubrežnih i tiroidnih hormona (Scheving & Pauly, 1966.). Zbog toga supresija izlučivanja melatonina izlaganjem svjetlosti utječe na pojavu širokog spektra bioloških posljedica.



Graf 3. Koncentracija melatonina ženke štakora u razdoblju od 12 h mraka i 12 h svjetlosti (Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/259386582\\_Effect\\_of\\_Spectral\\_Transmittance\\_through\\_Red-Tinted\\_Rodent\\_Cages\\_on\\_Circadian\\_Metabolism\\_and\\_Physiology\\_in\\_Nud](https://www.researchgate.net/publication/259386582_Effect_of_Spectral_Transmittance_through_Red-Tinted_Rodent_Cages_on_Circadian_Metabolism_and_Physiology_in_Nud))

Supresija melatonina ovisi o intenzitetu svjetlosti, njenoj valnoj duljini i vrsti domaćina. Studije su pokazale da prigušeno svjetlo intenziteta 0,25 luksa, širokog spektra, u štakora može potisnuti stvaranje melatonina u epifizi (Hill i sur., 1999.). S druge strane, kod laboratorijskih miševa su primijećene znatne razlike, ovisno o količini svjetlosti i vremenu. U istim uvjetima kod nekih je jedinki primijećena aktivnost melatonina, dok kod drugih nije (Goto i sur., 1989.).

#### *2. 2. 3. 2. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na metabolizam glodavaca*

Rezultati određenih istraživanja ukazuju na vezu između cirkadijalnog ritma i metaboličkih poremećaja. Glodavci s onemogućenom ekspresijom oscilirajućeg gena imaju abnormalne metaboličke fenotipe. Tako se u miševa s mutacijom oscilirajućeg gena razvio abnormalan metabolizam masti i glukoze (Yang i Santamaria., 2006.). U drugih je narušena veza između odgovora na inzulin i glukoneogeneze (Rudic i sur., 2004.). Promjene u kompoziciji tjelesne masti i toleranciji na glukozu kod pretilih miševa potencijalno mogu utjecati na rezultate istraživanja. Ponekad je aplikacija lijekova pretilim laboratorijskim miševima upitnog rezultata jer su farmakokinetički podatci o određenom lijeku dobiveni istraživanjima na miševima koji nisu bili pretili. Zbog manje mišićja u pretilih životinja, često se događa da su predozirani lijekovima ako su doze određivane isključivo na osnovi tjelesne mase (Cheymol, 2000.). Nadalje, povećana učestalost popratnih bolesti u pretilih životinja može oslabiti funkciju organa koji sudjeluju u eliminaciji lijekova, poput bubrega ili jetre.

#### *2. 2. 3. 4. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na imunosti sustav*

Imunosti sustav osjetljiv je na poremećaje cirkadijalnog ritma zbog ovisnosti broja i funkcije stanica imunosti sustava o dobu dana. Broj imunosti stanica i citokina/kemokina ovisi o ciklusu spavanje-budnost (Cermakian i sur., 2013.). Točnije, studije na glodavcima pokazuju povišenu razinu limfocita, granulocita, neutrofila i monocita tijekom dana u odnosu na noć, no broj NK (*natural killer*) stanica doseže svoj vrhunac na kraju razdoblja mraka (Hriscu, 2005.).

Smanjen broj limfocita i kronična upala nastala zbog cirkadijane disfunkcije oštećuju imunosti sustav i prethode pojavi raznih zaraznih i nezaraznih bolesti (Landskron i sur., 2014.). Ta patološka stanja ugrožavaju dobrobit životinja i kompromitiraju rezultate istraživanja. Važno je da svaka promjena aktivnosti i broja stanica imunosti sustava za vrijeme istraživanja bude isključivo posljedica pokusa

stoga je održavanje cirkadijalnog ritma od krucijalne važnosti za rezultate (Landskron i sur., 2014.).

#### 2. 2. 3. 5. Utjecaj poremećaja u cirkadijalnom ritmu na pojavnost tumora

Stope tumora u industrijaliziranim zemljama značajno su više nego drugdje te je izloženost svjetlosti po noći (SPN) jedan od brojnih čimbenika s kojim je povezan ovaj fenomen. Više od 99% američke i europske populacije živi u regijama sa značajnim svjetlosnim onečišćenjem (Falchi i sur., 2016.). Pojavnost raka dojke povezana je s prosječnom razinom osvjetljenja u 164 zemalja. Postoji snažna veza između razina SPN-a i raka dojke u tim zemljama (Kloog i sur., 2008.).

Laboratorijska istraživanja na životinjama također pokazuju povezanost između izloženosti životinja SPN-u i formaciji i progresiji tumora. Povećana učestalost spontanih mamarskih tumora u miševa pri stalnoj izloženosti svjetlosti prvi put je dokazana prije više od 60 godina (Jöchle, 1964.). Također, incidencija induciranih tumora mliječne žlijezde je povećana u štakora u uterusu izloženim konstantnoj svjetlosti u odnosu na one koji su bili izloženi tamnim noćima (Mhatre i sur., 1984.). No primijećeno je da aplikacija melatonina takvim štakorima po obrascu koji simulira noć uklanja štetne učinke SPN-a (Emmer i sur., 2018.).

#### 2. 2. 4. „Sretna“ životinja vs. rezultati pokusa

Trevor Poole je u svom znanstvenom radu pod nazivom Happy animal make good science sretnu životinju opisao kao jedinku koja je oprezna i aktivna (pokazuje široki spektar ponašanja), sposobna odmoriti se, samopouzdana je (ide van i ne pokazuje strah prema stimulansima koji nisu prijatna) te ne pokazuje nikakvo abnormalno ponašanje. U svom je članku postavio pitanje - osim što je za životinju bolje da bude sretna, utječe li njezino stanje uma i na rezultat znanstvenog istraživanja koje je nad njom provedeno (Poole, 1997.).

Kvaliteta pokusa koji se temelji na korištenju laboratorijskih životinja ovisi o tri bitna uvjeta. Prvo - postoji važan problem na koji rezultati pokusa trebaju pružiti odgovor; drugo - pokus treba polučiti nedvosmislene rezultate koji daju odgovor na pitanje; i treće - varijable koje nisu dio istraživanja treba strogo kontrolirati. Dobra laboratorijska znanost temelji se na normalnim i zdravim subjektima u pokusu, osim ako bolest sama po sebi nije predmet istraživanja. Kako bi se smanjila varijabilnost rezultata, a time i broj potrebnih životinja, važno je svaki nepotreban stres svesti na minimum (Poole, 1997.).

Također, kako bi se izbjegle zbunjujuće varijable, pokusne životinje bi trebale imati i normalnu fiziologiju i ponašanje. Neki bi mogli tvrditi da je ponašanje manje važno od fiziologije, no to se temelji na pogrešnoj pretpostavci da su um i tijelo odvojeni entiteti i da ne utječu jedan na drugog. No znanstvena su istraživanja rezultirala spoznajama kako mozak, ponašanje, hormoni pa čak i imunosni sustav skladno funkcioniraju u međuovisnosti te smetnja u jednom od ovih sustava obično utječe na drugi ili čak na sve ostale (Martin, 1989.).

Zapravo, bihevioralne promjene su obično osjetljiviji indikator anksioznosti ili patnje u odnosu na fiziološke. Poole je u svome radu naveo glavne čimbenike koji mogu utjecati na mentalnu dobrobit životinja (Poole, 1997.).

#### 2. 2. 5. Utjecaj nekih čimbenika okoline glodavaca na rezultate pokusa

Laboratorijski se miševi obično drže u kavezima u grupama razdvojenim po spolu. Dok ženke podnose takve uvjete, mušjaci se bore i uspostavljaju hijerarhiju. No tip društvene strukture ovisi o broju jedinki u kavezu. Poole i Morgan (1973.) su otkrili da je u malim kolonijama od 3-4 mužjaka agresija dominantnih usmjerena na nekoliko podređenih suparnika koji su zastrašeni i ograničeni u svojim kretnjama u kavezu. Međutim, pet mužjaka formiralo je linearnu hijerarhiju u kojoj je svaka jedinka znala svoje mjesto pa su na taj način podređeni mogli razviti strategiju za izbjegavanje sukoba. U većim kolonijama od devet ili više pojedinaca, dominantna skupina nije mogla kontrolirati takav veliki broj podređenih pa se društvena struktura raspala nakon 3 do 5 dana, a nakon toga je nastala nova dominantna skupina. To se razlikuje od situacije u malim skupinama do 5 jedinki gdje se agresija postupno smanjivala i bila minimalna nakon 12 do 15 dana. Fiziološki podaci su pokazali da podređeni miševi pokazuju veću razinu stresa i izlučuju više spolnih hormona nego dominantni. Osim što doživljavaju strah, trpe ozljede i imaju više razine stresnih hormona (Poole i Morgan, 1973.). Beden i Brain (1984., 1985.) su otkrili da je imunosni odgovor na antigen (ovčje crveno krvno zrnice) smanjen kod podređenih i poraženih miševa. Brayton i Brain (1973.) su dokazali da što je veći broj miševa u kavezu, to je manja njihova otpornost na digeneju (parazitski crvi) te su Edwards i Dean (1977.) potvrdili da pretjerivanje u broju jedinki smještenih na jedinicu površine utječe na njihov imunosni odgovor.

## 2. 2. 6. Utjecaji odabranih fizičkih čimbenika okoliša glodavaca na rezultate pokusa

Sve je više dokaza da postoji niz fizičkih okolišnih čimbenika koji utječu na psihološko stanje životinje i mogu utjecati na njezin imunski sustav. Neugodni događaji, npr. neizbježni električni udari povećavaju učestalost tumora u štakora (Keller i sur., 1981.). Ipak, ponekad stres može biti koristan. Tako su se miševi koji su bili trenirani da izbjegavaju strujni udar pokazali otpornijima na malariju kod kontrolne skupine koja nije bila trenirana (Poole, 1997.).

Blagi nepredvidivi stresori (oduzimanje vode, kontinuirano osvjetljenje, kavez pod nagibom, zaprljani kavez, glasni zvukovi) pokazalo se da potiču apetit miševa i štakora za slatkim (Willner i sur., 1987.). Ovakve nekontrolirane varijable mogu ozbiljno kompromitirati rezultate pokusa u kojima se životinje nagrađuju hranom. Također, izlaganje svjetlu, najčešće zbog smještaja kaveza visoko na stalku, kod glodavaca može uzrokovati degeneraciju retine, učestaliji prenatalni mortalitet i smanjenje stope rasta (Clough, 1984.).

Jedan od najstresnijih događaja u svakom uzgoju je promjena okruženja, npr. glodavci se često bore kada budu premješteni u drugi kavez. Još je stresnija situacija u kojoj se životinja iz svog poznatog kaveza premjesti u nepoznati, a zatim se podvrgne pokusu. Dobra praksa je dati životinji dovoljno vremena da se prilagodi na novi prostor – ne samo zbog dobrobiti, već i zbog potencijalnog ugrožavanja rezultata istraživanja (Poole, 1997.).

Damon i suradnici (1986.) su uspoređivali nefrotoksični odgovor štakora na implantirani pročišćeni uranij. Prvo su uranij implantirali u štakore skupine I i zatim ih premjestili u metabolički kavez. Skupina II je imala 21 dan da se aklimatizira na metabolički kavez prije implantacije, dok je skupina III bila smještena u polikarbonatni kavez 21 dan te je tada izvršena implantacija. Pokazalo se da je za skupinu I doza od 3 do 8 mg/kg bila toksična, dok je za skupine II i III toksična doza bila 220 do 650 mg/kg. Ovaj primjer konkretno dokazuje važnost izvođenja pokusa u poznatom okruženju (Damon i sur., 1986.).

### 3. RASPRAVA

Unatoč brojnim, do danas razvijenim, alternativnim sustavima kojima se zamjenjuju žive životinje koje bi se inače koristile u pokusima, još uvijek, mnoga istraživanja, posebice u području biomedicine i zdravstva, nije moguće provesti bez korištenja živih životinja kao pokusnih modela. Unatoč strogo kontroliranoj primjeni 3R načela pri korištenju životinja u pokusima, koja su do danas evoluirala sve do 11R načela, često je u pokusima gotovo nemoguće predvidjeti sve okolnosti koje mogu dovesti do pojave različitih varijabli koje na kraju mogu utjecati na vjerodostojnost rezultata. Stoga, svaki će istraživač nastojati predvidjeti i kontrolirati takve okolnosti koje bi mogle negativno utjecati na vjerodostojnost rezultata i mogućnost ponovljivosti pokusa.

Dva su značajna čimbenika koje treba pomno nadzirati kako bi se minimalizirala mogućnost pojave nekontroliranih varijabli. To su hranidba, te smještaj, odnosno držanje pokusnih životinja. U ovom preglednom diplomskom radu razmatrane su neke osnovne okolnosti koje se odnose na hranidbu te smještaj i držanje najčešće korištenih životinja u pokusima, miševa i štakora.

Striktana primjena Pet sloboda značajno pridonosi osiguravanju dobrobiti glodavaca korištenih u pokusima, no samo dobro poznavanje fizioloških i etoloških potreba vrste, ali i soja glodavca, može biti jamstvom osiguravanja njihove dobrobiti pa samim time i postizanjem i održavanjem fizičkog i mentalnog zdravlja životinje kao osnovnog preduvjeta za ostvarivanje u pokusu zacrtanih ciljeva.

Pokazalo se da okolišni čimbenici, na primjer, značajno mogu utjecati na unos hrane i vode. Na unos hrane i vode, primjerice, utječe temperatura okoliša pa tako povećanje temperature na 29 do 33°C značajno smanjuje konzumaciju (Overton i Williams, 2004.). S druge strane, „poslastice“ rasute po podu kaveza s namjenom da se njima obogati okoliš mogu, ukoliko se njihova kalorijska vrijednost ne pribroji ukupno potrebnoj dnevnoj kalorijskoj vrijednosti hrane, uzrokovati pretilost. A osim okolišne temperature, na konzumaciju hrane i vode mogu utjecati društveno okruženje, izmjena ciklusa svjetlosti i mraka te čak i položaj kaveza na polici u sekundarnom smještajnom objektu (Rowland, 2007.). Nikako se ne smije zanemariti povećana potreba za hranom jedinki koje su gravidne ili u laktaciji (Rowland, 2007.), ali treba uzeti u obzir i karakteristiku mnogih glodavaca da nerado ili uopće ne žele konzumirati njima nepoznatu hranu (neofobija) (File, 2001.).

Zadovoljavanje etoloških potreba nužno je kako bi se izbjeglo da ih životinje zadovoljavaju na neprikladan način ugrožavajući svoje zdravlje i nanoseći si bol kao što je to slučaj u glodavaca kojima je uskraćena mogućnost glodanja pa glodajući jedino dostupne rešetke kaveza oštećuju zube (Pujo, 2021.; Bradley Bays, 2006.).

Iako uobičajeni, neki načini držanja, hranjenja i postupaka sa glodavcima pokazali su se kao uzrok pojave nekontroliranih varijabli s negativnim utjecajem na rezultate pokusa. Tako, na primjer, većinom uobičajeno hranjenje po volji (*ad libitum*) često dovodi do pojave prekomjerne tjelesne mase koja može rezultirati različitim komorbiditetima. Uočeno je da smanjenje ukupne količine dnevno ponuđene hrane štakorima za 20% može produljiti njihov životni vijek i smanjiti pojavnost nekih neoplazija (Koolhaas, 2010.).

Mnoge tvari u uobičajenoj hrani za glodavce, poput fitoestrogena, mogu se također pokazati kao varijabla s većim utjecajem na rezultate pokusa (Thigpen i sur., 1999.).

Varijabla na koju također treba obratiti pozornost prilikom planiranja pokusa je način hranjenja glodavaca. Prvenstveno se to odnosi na učestalost hranjenja odnosno rasporede hranjenja kojima se nastoji standardizirati pokus i koji često nisu u skladu s onim u prirodi te, umjesto standardizacije pokusa s namjerom isključivanja nekontroliranih varijabli rezultat je ometani ritam napajanja, hranjenja, a posredno i spavanja čime se narušava dobrobit životinja.

Iako su kratkotrajna razdoblja restrikcije hrane potrebna za određene pokuse te mogu poboljšati standardizaciju i ponovljivost eksperimenata, uskraćivanje hrane u periodu od 24 sata u odnosu na *ad libitum* prehranu u različitim životinja rezultira različitim metaboličkim odgovorima (Strubbe i sur., 1986.).

Prisilno hranjenje također je, iako ponekad nužno, postupak kojim se životinja dovodi u stanje značajnog stresa što također može utjecati na rezultate pokusa. Stoga, ukoliko je takav način hranjenja nužan, potrebno je životinje postepeno navikavati na takav postupak te im nagrađivanjem ublažiti negativne učinke postupka prisilnog hranjenja (Strubbe, 1992.).

Neki od bitnijih okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na fizičko i mentalno stanje životinje, pa prema tome i posredno utjecati na rezultate pokusa su, na primjer, visina i prostranost primarnog smještaja, odnosno kaveza, materijal od kojeg je kavez izrađen kaveza, intenzitet osvjetljenosti, okolišna temperatura, relativna vlažnost zraka, izloženost buci, vibracijama, štetnim plinovima, prašini...Stoga je bitna opremljenost

kaveza strukturama koje glodavcima pružaju mogućnost samostalne regulacije tjelesne topline, skrivanje i povlačenje pred okolinom, odnosno mogućnost zadovoljenja drugih fizioloških i etoloških potreba.

Uvjeti koji nisu u skladu sa standardima mogu dovesti do abnormalnih ponašanja kao što su povećana agresivnost i stereotipije (Ritskes-Hoitinga i Chwalibog, 2002.).

Poštivanje cirkadijalnog ritma u životinja je od iznimnog značaja za njihovu dobrobit odnosno način na koji će se nositi s okolišem. Poremećeni cirkadijalni ritam snažno utječe na fiziološke procese u organizmu kroz tri ključna mehanizma: promjenu ekspresije oscilirajućeg gena zaduženog za prepoznavanje cirkadijalnog ritma, supresiju izlučivanja hormona melatonina i stimulaciju simpatikusa. Izlaganjem laboratorijskih glodavaca svjetlosti u trajanju od samo 15 minuta za vrijeme faze mraka može se povećati bazalna ekspresija gena za prepoznavanje cirkadijalnog ritma i time intenzivirati dnevnu aktivnost životinja (Shigeyoshi i sur., 1997.). Hormon melatonin ima značajan broj fizioloških funkcija posredovanih receptorima (npr. cirkadijalna regulacija, imunosna modulacija) i neovisnih o receptorima (npr. uklanjanje slobodnih radikala, detoksikacija) (Reiter, 2009.). Promjene u razini melatonina narušavaju hormonalnu ravnotežu što se očituje kroz promijenjene razine reproduktivnih, nadbubrežnih i tiroidnih hormona (Scheving & Pauly, 1966.). Smanjen broj limfocita i kronična upala nastala zbog cirkadijalne disfunkcije oštećuju imunosni sustav i prethode pojavi raznih zaraznih i nezaraznih bolesti (Landskron i sur., 2014.). Laboratorijska istraživanja na životinjama također pokazuju povezanost između izloženosti životinja svjetlosti po noći i formaciji i progresiji tumora. Povećana učestalost spontanijih mamarnih tumora u miševa pri stalnoj izloženosti svjetlosti prvi put je dokazana prije više od 60 godina (Jöchle, 1964.).

Ponekad čak i izloženost niskim razinama stresa može na neki način utjecati na rezultate pokusa. tako na primjer, uočeno je da sasvim blagi, ali nepredvidivi stresovi (oduzimanje vode, kontinuirano osvjetljenje, kavez pod nagibom, zaprljani kavez, glasni zvukovi) potiču apetit miševa i štakora za slatkim (Willner i sur., 1987.). Ovakve nekontrolirane varijable mogu ozbiljno kompromitirati rezultate pokusa u kojima se životinje nagrađuju hranom.

Od nemalog značaja također je i okolina koja okružuje glodavca. Bitno je poznavati ne samo fiziološke i etološke potrebe, već i društveno ponašanje glodavaca, ali i važnost izvođenja pokusa u poznatoj okolini i okolišu koji sami po sebi ne predstavljaju novi stresni moment za životinju u pokusu.



#### 4. ZAKLJUČCI

- 1) Prilikom planiranja pokusa nužno je dobro poznavanje fizioloških i etoloških potreba vrste, ali i soja životinje koja će biti korištena kao pokusni model.
- 2) Tijekom pokusa nekontrolirane varijable mogu značajno utjecati na rezultate pokusa te njihovu vjerodostojnost kao i ponovljivost pokusa učiniti upitnima.
- 3) Hranidba, smještaj i držanje životinja, čak i ako su uobičajeni, često mogu biti izvor nekontroliranih varijabli u pokusu.
- 4) Minimaliziranje nekontroliranih varijabli i standardizacija pokusa osnovni je preduvjet za ostvarivanje ciljeva pokusa.

## 5. LITERATURA

1. ANONYMUS: Zakon o zaštiti životinja. Narodne novine br. 102/2017
2. ANONYMUS: Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta
3. Animal Research Review (2007): Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions.  
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012426400750042X?via%3Dihub> [20.04.2021.]
4. Barnes, S. (1997): The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1023/A:1005956326155> [04.04.2021.]
5. Bartness, T. J. (2009): Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis.  
Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720709004559?via%3Dihub> [20.04.2021.]
6. Beden, S. N., P. F. Brain (1984): Effects of attack-related stress on the primary immune responses to sheep red blood cells in castrated mice.  
Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/264086588\\_Beden\\_SN\\_and\\_Brain\\_PF\\_1984\\_Effects\\_of\\_attack-related\\_stress\\_on\\_the\\_primary\\_immune\\_response\\_to\\_sheep\\_red\\_blood\\_cells\\_in\\_castrated\\_mice\\_IRCS\\_Medical\\_Science\\_12\\_675](https://www.researchgate.net/publication/264086588_Beden_SN_and_Brain_PF_1984_Effects_of_attack-related_stress_on_the_primary_immune_response_to_sheep_red_blood_cells_in_castrated_mice_IRCS_Medical_Science_12_675) [17.07.2021.]
7. Beden, S. N., P. F. Brain (1985): The primary immune responses to sheep red blood cells in mice of differing social rank or from individual housing. APA, Washington, DC. Dostupno na: <https://doi.org/10.13140/2.1.4442.6881> [28.04.2021.]
8. Björnhag, G. (1987): Comparative aspects of digestion in the hindgut of mammals. The colonic separation mechanism. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 36, str. 33-36.
9. Boettger-Tong, H., L. Murthy, C. Chiappetta (1998): A Case of a Laboratory Animal Feed with High Estrogenic Activity and Its Impact on in Vivo Responses to Exogenously Administered Estrogens. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/13646434\\_A\\_Case\\_of\\_a\\_Laboratory\\_Ani](https://www.researchgate.net/publication/13646434_A_Case_of_a_Laboratory_Ani)

- mal\_Feed\_with\_High\_Estrogenic\_Activity\_and\_Its\_Impact\_on\_in\_Vivo\_Response\_s\_to\_Exogenously\_Administered\_Estrogens [25.04.2021.]
10. Bradley Bays, T., T. Lightfoot, J. May (2006): *Exotic Pet Behavior*, Saunders, Pennsylvania, str. 239-261.
  11. Bubić Špoljar, J., G. Gregurić Gračner, D. Gračner, A. Dovč, K. Fuš, N. Lončarić, Ž. Pavičić (2019): 3R načelo u zaštiti dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe - jučer, danas, sutra. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/223369> [15.04.2021.]
  12. Cermakian, N., T. Lange, D. Golombek, D. Sarkar, A. Nakao, S. Shibata, G. Mazzocchi (2013): Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. Dostupno na: <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.782315> [28.04.2021.]
  13. Chamove, A. S. (1989): Cage design reduces emotionality in mice. Dostupno na: <https://sci-hub.se/10.1258/002367789780810608> [11.09.2021.]
  14. Cheymol, G. (2000): Effects of obesity on pharmacokinetics implications for drug therapy. Dostupno na: <https://doi.org/10.2165/00003088-200039030-00004> [02.05.2021.]
  15. Clough, G. (1984): Environmental factors in relation to the comfort and well-being of laboratory rats and mice. In: *Standards in Laboratory Animal Management* (UFAW, ed). Potters Bar, Hertfordshire, UK, str. 7-24.
  16. Damon, E. G., A. F. Eidson, C. H. Hobbs, F. F. Hahn (1986): Effect of acclimation on nephrotoxic response of rats to uranium. *Laboratory Animal Science*, US, 36, str. 24-27.
  17. Dixon, D. P., A. M. Ackert, L. A. Eckel (2003): Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2003.08.008> [05.05.2021.]
  18. Edwards, E. A., L. M. Dean (1977): Effects of crowding mice on humeral antibody formation and protection to lethal antigenic challenge. Dostupno na: <https://sci-hub.se/10.1097/00006842-197701000-00003> [07.09.2021.]
  19. Elicher, M. (2019): The Five Freedoms: A history lesson in animal care and welfare. Dostupno na: [https://www.canr.msu.edu/news/an\\_animal\\_welfare\\_history\\_lesson\\_on\\_the\\_five\\_freedoms](https://www.canr.msu.edu/news/an_animal_welfare_history_lesson_on_the_five_freedoms) [10.05.2021.]
  20. Emmer, K. M., K. L. G. Russart, W. H. Walker, R. J. Nelson, A. Courtney DeVries (2018): Effects of Light at Night on Laboratory Animals and Research Outcomes. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062441/>

[16.04.2021.]

21. Falchi, F. (2016): The new world atlas of artificial night sky brightness.  
DOI: 10.1126/sciadv.1600377
22. Fawcett, A. (2012): Guidelines for the Housing of Mice in Scientific Institutions.  
Dostupno na: [https://www.animaethics.org.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0004/249898/Guideline-22-mouse-housing.pdf](https://www.animaethics.org.au/__data/assets/pdf_file/0004/249898/Guideline-22-mouse-housing.pdf) [17.08.2021.]
23. File, S. E. (2001): Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00292-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00292-3) [14.09.2021.]
24. Fitzsimmons, J. T. (1989): Effects of soyabean and ascorbic acid on experimental carcinogenesis. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90218-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90218-1) [21.04.2021.]
25. Goto M., I. Oshima, T. Tomita, S. Ebihara (1998): Melatonin Content of the Pineal Gland in Different Mouse Strains.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1989.tb00667.x> [15.04.2021.]
26. Hart, R. W., A. Turturro (1997): Dietary Restrictions and Cancer. Dostupno na: <https://doi.org/10.2307/3433316> [13.05.2021.]
27. Hart, R. W., D. A. Neumann, R. T. E. Robertson (1995): Dietary Restriction: Implications for the Design and Interpretation of Toxicity and Carcinogenicity Studies. Dostupno na: <https://doi.org/10.2307/3433316> [14.08.2021.]
28. Hedrich, H. (2004): The Laboratory Mouse, Academic Press, Cambridge, MA, str. 395-408.
29. Hill, S. M., V.P. Belancio, R.T. Dauchy, S. Xiang, S. Brimer, L. Mao, A. Hauch, P. W. Lundberg, W. Summers, L. Yuan, T. Frasch, D.E. Blask (2015): Melatonin: an inhibitor of breast cancer. Dostupno na: <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0030> [15.05.2021.]
30. Hriscu, M. (2004): Modulatory factors of circadian phagocytic activity.  
DOI: 10.1196/annals.1356.032
31. Jöchle, W. (1964): Trends in photophysiologic concepts. Dostupno na: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1964.tb48164.x> [19.06.2021.]
32. Keenan, K. P., G. C. Ballam, K. A. Soper, P. Laroque, J. B. Coleman, R. Dixit (1999): Diet, Caloric Restriction, and the Rodent Bioassay. Dostupno na: <http://www.ask->

- force.org/web/Seralini/Keenan-Diet-Caloric-Restriction-Rodent-Bioassay-1999.pdf  
[13.09.2021.]
33. Keller, S. E., J. M. Weiss, N. E. Miller, M. Stein (1981): Suppression of immunity by stress: effect of graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat.  
Dostupno na: <https://sci-hub.se/10.1126/science.6973822> [08.09.2021.]
  34. Kloog, I., A. Haim, R. G. Stevens, M. Barchana, B. A. Portnov (2008): Light at night Co-distributes with incident breast but not lung cancer in the female population of Israel. DOI: 10.1080/07420520801921572
  35. Koolhas, J. M. (2010): The laboratory rat (Eds: R. Hubrecht, & J. Kirkwood, Eds.), The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Willey Blackwell, NJ, str. 311., 26.
  36. Lamartiniere, C. A., J. Moore, M. Holland, S. Barnes (1995): Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer.  
DOI: 10.3181/00379727-208-43843
  37. Landskron, G., M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, M. A. Hermoso (2014): Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment.  
DOI: 10.1155/2014/149185
  38. Lawlor, M. M. (2002): Comfortable quarters for rats in research institutions (Eds: Reinhardt, V., A. Reinhardt), Comfortable Quarters for Laboratory Animals, Animal Welfare Institute, Washington, str. 26-32.
  39. Leakey, J. E. A., J. E. Seng, J. R. Latendresse, N. Hussain, L. J. Allen, W. T. Allaben (2003): Dietary controlled carcinogenicity study of chloral hydrate in male B6C3F1 mice. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2003.07.007> [20.08.2021.]
  40. Lee, K. W., H. J. Wang, P. A. Murphy, S. Hendrich (1995): Soybean isoflavone extract suppresses early but not later promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital in female rat liver. DOI: 10.1080/01635589509514416
  41. Lee, S. J., T. Liu, A. Chatteraj, S. L. Zhang, L. Wang, T. M. Lee, M. M. Wang, J. Borjigin (2009): Posttranscriptional regulation of pineal melatonin synthesis in *Octodon degus*. DOI: [10.1111/j.1600-079X.2009.00690.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00690.x) [12.04.2021.]
  42. Makowska, I. J., B. Franks, C. El-Hinn, T. Jorgensen, D. M. Weary (2019): Standard laboratory housing for mice restricts their ability to segregate space into clean and dirty areas. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42512-3> [18.07.2021.]
  43. Makowska, I. J., D. M. Weary (2016): The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats.

- Dostupno na: <https://doi.org/10.1098/RSOS.160136> [16.06.2021.]
44. Martin, P. (1989): Psychoimmunology: relations between brain, behaviour and immune function. In: Perspectives in Ethology 8: Whither Ethology!, Bateson PPG, Klopfer PH, Plenum Press, New York, US, str. 173-214.
45. Mašek, T., D. Brozić (2019): Hranidba i dobrobit životinja. U: Dobrobit životinja (urednici: Pavičić, Ž. i M. Ostović), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Naklada Slap, Zagreb, RH, str. 303-311.
46. Mhatre, M. C., P. N. Shah, H. S. Juneja (1984): Effect of varying photoperiods on mammary morphology, DNA synthesis, and hormone profile in female rats.  
Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6427503/> [12.04.2021.]
47. Moraal, M., P. P. A. M. Leenaars, H. Arnts, K. Smeets, B. S. Savenije, J. H. A. J. Curfs, M. Ritskes-Hoitinga (2012): The influence of food restriction versus ad libitum feeding of chow and purified diets on variation in body weight, growth and physiology of female wistar rats.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1258/la.2011.011011> [23.06.2021.]
48. Overton, J. M., T. D. Williams (2004): Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2004.04.025> [24.07.2021.]
49. Poole, T. (1997): Happy animals make good science.  
Dostupno na: [10.1258/002367797780600198](https://doi.org/10.1258/002367797780600198) [28.08.2021.]
50. Poole, T. B., H. D. R. Morgan (1973): Differences in aggressive behaviour between male mice (*Mus musculus*) in colonies of different sizes.  
DOI: [10.1016/s0003-3472\(73\)80105-8](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(73)80105-8)
51. Pollard, M., P. H. Luckert (1997): Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats.  
DOI: [10.1080/01635589709514551](https://doi.org/10.1080/01635589709514551)
52. Pujo, L. J. (2021): Rats and Mice: The Damage They Cause.  
Dostupno na: <https://www.thespruce.com/damage-from-rats-and-mice-2656752> [01.09.2021.]
53. Reiter, J. Russel, D. X. Tan, A. Korkmaz (2009): The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000358832.41181.bf> [16.08.2021.]
54. Ritskes-Hoitinga, M., A. Chwalibog (2002): Nutrient requirements, experimental design, and feeding schedules in animal experimentation. Handbook of Laboratory

- Animal Science, Second Edition: Essential Principles and Practices, 1(February 2016), str. 281–310. Dostupno na: <https://doi.org/10.1201/b10416-12> [07.07.2021.]
55. Rowland, N. E. (2007): Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry.  
Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17536615/> [29.08.2021.]
56. Rudic, R. D., P. McNamara, A. M. Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch, G. A. Fitzgerald (2004): BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377> [25.07.2021.]
57. Cheetham S. A., A. L. Smith, S. D. Armstrong, R. J. Beynon, J. L. Hurst (2009): Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2008.10.005> [03.09.2021.]
58. Scheving, L., J. Pauly (1966): Effect of light on corticosterone levels in plasma of rats. Dostupno na: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1966.210.5.1112> [03.09.2021.]
59. Setchell, K. D. R., H. Adlercreutz (1988): Mammalian lignans and phyto-estrogens: recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease, I. Rowland (ed.), Role of the gut flora in toxicity and cancer. Academic Press, Ltd., London, str. 315-345.
60. Sherwin, C. M., E. F. Glen (2003): Cage colour preferences and effects of home cage colour on anxiety in laboratory mice.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1006/ANBE.2003.2286> [18.07.2021.]
61. Sherwin, C. M., E. Haug, N. Terkelsen, M. Vadgama (2004): Studies on the motivation for burrowing by laboratory mice.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2004.03.009> [02.07.2021.]
62. Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J. J. Loros, J. C. Dunlap, H. Okamura (1997): Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8) [14.09.2021.]
63. Sprott, R. L. (2018): Rodents.  
Dostupno na: <https://www.encyclopedia.com/plants-and-animals/animals/vertebrate-zoology/rodents#2-1E1:rodent-full> [14.04.2021.]
64. Strubbe, J. H. (1992): Parasympathetic involvement in rapid meal -associated conditioned insulin secretion in the rat.

DOI:10.1152/ajpregu.1992.263.3.R615

65. Strubbe, J. H., A. Prins, A. J. Alingh (1986): Reduced Insulin Secretion After Short-Term Food Deprivation in Rats Hays a Key Role in the Adaptive Interaction of Glucose and Free Fatty Acid Utilization.  
Dostupno na: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.879.4897&rep=rep1&type=pdf> [04.08.2021.]
66. Strubbe, J. H., S. C. Woods (2004): The Timing of Meals.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.1037/0033-295X.111.1.128> [05.09.2021.]
67. Thigpen, J. E., K.D.R. Setchell, K. B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Caviness, M. F. Goelz, J. K. Haseman, R. R. Newbold, D. B. Forsythe (1999): Phytoestrogen content of purified, open- and closed-formula laboratory animal diets.  
Dostupno na: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/1999/00000049/00000005/art00013?crawler=true> [12.09.2021.]
68. Vachon , C., J. D. Jones, P. J. Wood, L. Savoie (1988): Concentration effect of soluble dietary fi bers on postprandial glucose and insulin in the rat.  
DOI: [10.1139/y88-127](https://doi.org/10.1139/y88-127)
69. Van De Weerd, H. A., F. A. R. Van Den Broek, V. Baumans (1996): Preference for different types of flooring in two rat strains.  
Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00654-0](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00654-0) [16.08.2021.]
70. Willner, P., A. Towell, D. Sampson, R. Muscat, S. Sopholeous (1987): Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. DOI: [10.1007/BF00187257](https://doi.org/10.1007/BF00187257)
71. Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J., J. Loros, J. C. Dunlap, H. Okamura (1997): Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8) [05.06.2021.]
72. Yang, Y., P. Santamaria (2006): Lessons on autoimmune diabetes from animal models. Dostupno na: <https://doi.org/10.1042/CS20050330> [07.09.2021.]
73. Yarto-Jaramillo E. (2015) Rodentia. U: Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Miller R. E., Fowler M. E., ur., Saunders, St. Louis, MO, str. 384-422.



## 6. SAŽETAK

### UTJECAJ PREHRANE I DRŽANJA ŽIVOTINJA NA REZULTATE ISTRAŽIVANJA

Brojne su varijable koje mogu utjecati na rezultate pokusa u smislu njihove vjerodostojnosti kao i ponovljivosti pokusa. Hranidba i držanje često su izvor takvih varijabli. Životinje, udaljene od svog prirodnog okoliša, smještene u kaveze, nisu u mogućnosti same zadovoljiti svoje fiziološke i etološke potrebe. Međutim, kako bi se one na zadovoljavajući način osigurale, potrebno je pri planiranju pokusa podrobno poznavati osobitosti vrste i soja glodavca namijenjenog korištenju u pokusima. Često čak i uobičajeni načini hranjenja, napajanja i držanja životinja mogu dovesti do pojave određenih varijabli koje će posredno utjecati na rezultate pokusa.

**Ključne riječi:** hranidba, držanje, glodavci, pokus, varijable

## 7. SUMMARY

### THE INFLUENCE OF ANIMAL DIET AND HUSBANDRY ON RESEARCH RESULTS

There are many factors that can influence the outcome of an experiment, specifically its credibility and the ability to get the same results upon repetition. Diet and housing are often the source of those variables. Animals, distanced from their natural habitat and caged, are not able to satisfy their physiological and ethological needs. In order to let the animals address their needs, it's necessary to recognise peculiarities of the particular rodent species and strain intended for experiment use when preparing for the experiment. However, even the most common ways of animal feeding and husbandry can lead to certain factors arising which can then alter experimental results.

**Key words:** diet, housing, rodents, experiment, variables

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 4. lipnja 1996. godine u Bjelovaru gdje sam uz osnovnu školu završila i osnovnu glazbenu školu – smjer saksofon. 2011. upisujem Gimnaziju Bjelovar-prirodoslovno-matematički smjer u kojoj sam i maturirala godine 2015. kada upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.