



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ana VENGAR

**VPLIVI NAČINOV ROKOVANJA NA STRES PRI  
LABORATORIJSKIH MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ana VENGAR

**VPLIVI NAČINOV ROKOVANJA NA STRES PRI  
LABORATORIJSKIH MIŠIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**EFFECTS OF HANDLING LABORATORY MICE ON STRESS**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Kmetijstvo – zootehnika.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Tatjano Pirman.

Recenzent: izr. prof. dr. Aleš Kuhar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Irena ROGELJ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: izr. prof. dr. Tatjana PIRMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: izr. prof. dr. Aleš KUHAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum predstavitve:

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 57.084(043.2)=163.3
- KG poskusne živali, laboratorijske miši, stres, dobrobit živali, rokovanje, metode rokovanja
- AV VENGAR, Ana
- SA PIRMAN, Tatjana (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Univerzitetni študijski program 1. stopnje Kmetijstvo – zootehnika
- LI 2019
- IN VPLIVI NAČINOV ROKOVANJA NA STRES PRI LABORATORIJSKIH MIŠIH
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VII, 18 str., 6 pregl., 6 sl., 8 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Delo z laboratorijskimi živalmi zahteva dnevni stik miši s skrbnikom. Trenutno se za vsakodnevno rokovanje uporablja klasična metoda prijem za rep. Znano je, da prijem za rep mišim povzroča nelagodje in stres. Žival, ki je med izvajanjem poskusov pod stresom, ne bo izrazila naravnega obnašanja. To ima lahko vpliv na pridobljene rezultate. Uvajata se dve novi metodi rokovanja, ki naj bi bili za miši manj stresni ter spodbujali prostovoljno približevanje rokovalcu. To sta metoda rokovanja z odprto dlanjo in rokovanje s tunelom. Tekom diplomskega dela smo poskušali potrditi pozitiven vpliv obeh novih metod, tako da smo devet dni zaporedoma, izvajali vse tri prej omenjene načine rokovanja. Prvi, peti in deveti dan smo izvedli preizkus interakcije. Z merjenjem časa, ki so ga miši preživele v interakciji z rokovalcem smo določili vpliv posamezne metode. V poskusu smo uporabili tri različne linije ter oba spola živali. Tako smo lahko analizirali tudi vpliv linije in spola na prilagoditev posamezni metodi rokovanja. Izkazalo se je, da se miši najhitreje privadijo rokovanju s tunelom, sledi metoda z odprto dlanjo in kot zadnja je klasična metoda prijema za rep.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 57.084(043.2)=163.6
- CX laboratory animals, laboratory mice, stress, animal welfare, handling, handling methods
- AU VENGAR, Ana
- AA PIRMAN, Tatjana (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science, Academic Study Programme in Agriculture – Animal Production
- PY 2019
- TY EFFECTS OF HANDLING LABORATORY MICE ON STRESS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VII, 18 p., 6 tab., 6 fig., 8 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Working with laboratory animals requires daily contact of mice with the handler. At that moment the most common method to handle laboratory mice is to pick up and restrain the mouse by tail. Picking up by tail is known to cause the anxiety and stress. The animal, which is under pressure during the experiment, will not express its natural behavior. This can have an impact on the results. There are two new methods of handling that led to voluntary approach and low anxiety. These are handling by tunnel and cupping mice on the open hand. In the B. Sc. Thesis we tried to confirm positive influence of both new methods. We performed all handling methods of handling for nine consecutive days. We made the interaction test on the first, fifth and ninth day. We determine the influence of each method by measuring the time that mice stay in interaction with the handler. In the experiment, we used three different lines and both genders. So we were able to analyse the influence of the line and gender to the different handling methods. Results showed the best responses to the handling by tunnel, followed by open hand and as expected the last picking up by tail.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VII
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE DELA</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	MATERIALI	5
<b>3.2</b>	METODE	5
<b>3.2.1</b>	<b>Postopek rokovanja</b>	<b>6</b>
3.2.1.1	Metoda prijema za rep	6
3.2.1.2	Metoda rokovanja s tunelom	7
3.2.1.3	Metoda z odprto dlanjo	8
<b>3.2.2</b>	<b>Postopek in merjenje interakcije</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>10</b>
4.1	POVPREČNO TRAJANJE ENE INTERAKCIJE	12
4.2	VPLIV SPOLA	13
4.3	VPLIV LINIJE	15
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>VIRI</b>	<b>18</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povprečno število in čas interakcij pred in po rokovanju prvi, peti in deveti dan poskusa	10
Preglednica 2: Povprečni delež časa interakcije pred in po rokovanju glede na metodo rokovanja	11
Preglednica 3: Povprečno trajanje ene interakcije pred in po rokovanju	12
Preglednica 4: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 3. interakciji glede na linijo	15
Preglednica 5: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 2. interakciji glede na linijo	15
Preglednica 6: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 3. interakciji glede na linijo	16

## KAZALO SLIK

Slika 1: Prijem za rep	7
Slika 2: Rokovanje s pomočjo tunela	7
Slika 3: Metoda odprte dlani	8
Slika 4: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi rep	13
Slika 5: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi tunel	14
Slika 6: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi dlan	14



## 1 UVOD

Rokovanje z laboratorijskimi živalmi ima velik vpliv na obnašanje živali v poskusih. Klasičen prijem miši za rep povzroča stres, strah in nelagodje. Posledično se zgodi, da se živali v raziskavah in poskusih ne obnašajo naravno. Le to ima lahko vpliv na rezultate, še posebno pri študijah obnašanja. Stres je mogoče zmanjšati z za živali manj stresnimi metodami rokovanja. Z mišmi lahko poleg klasičnega prijema za rep, rokujemo tudi s tunelom ali z metodo odprte dlani.

Hurst in West (2010) v svojih študijah raziskujeta odziv živali glede na različne načina rokovanja. Zanimivo je, da so različne metode testiranja pripeljale do podobnih rezultatov. Za miši najmanj stresen se je izkazal tunel, sledila je metoda rokovanja z odprto dlanjo in kot pričakovano je bila klasična metoda držanja za rep najbolj stresna za miši.

Z raziskavo v okviru diplomskega dela smo poizkušali potrditi, da rokovanje z odprto dlanjo oz. s tunelom povzroča manj nelagodja in strahu kot rokovanje s prijemom za rep. V praktičnem delu naloge smo devet zaporednih dni rokovali na vse prej omenjene načine. Prvi, peti in zadnji dan rokovanja smo izvedli preizkus interakcije. Glede na izmerjene rezultate smo nato analizirali vpliv posamezne metode rokovanja na stres.

Namen diplomskega dela je proučiti ali rokovanje z odprto dlanjo in s tunelom povzročata manj nelagodja, strahu in stresa kot klasičen prijem miši za rep tudi pri naših FHI »lean« in FLI »fat« linijah.. Predvidevamo tudi, da novi metodi rokovanja: rokovanje z odprto dlanjo in s tunelom spodbudita prostovoljno približevanje osebi, ki z mišmi rokuje in povzročata manj nelagodja kot prijem za rep.

## 2 PREGLED OBJAV

Rokovanje z laboratorijskimi živalmi je splošno znan povzročitelj nelagodja. Vpliva na raziskovalno naravo živali, kar zmanjšuje možnost učenja in reševanja specifičnih nalog zastavljenih v poskusu. V študijah obnašanja se je stres povzročen z rokovanjem izkazal kot eden izmed glavnih razlogov za neuspeh (Miller in Leach, 2015).

Okoljski stres, do katerega prihaja v laboratoriju, vpliva na obnašanje živali v vedenjskih poskusih. Posledice stresa se kažejo v nerazložljivih odstopanjih rezultatov pridobljenih v različnih poskusih in raziskavah. Dvom v zanesljivost rezultatov zaradi slabe ponovljivosti rezultatov, povzroča težave pri napredovanju raziskovanja. Še eden izmed problemov, ki lahko nastane, kadar v poskusih sodelujejo živali, ko so v stresu, pa je nezmožnost ponovljivosti poskusa oziroma pridobitve primerjalnih rezultatov (Novak in sod, 2015).

Najpogosteje uporabljena metoda, ki je hkrati tudi edina standardizirana in navedena v protokolih je klasična metoda prijema miši za rep. Rokovalec miš prime in vzdigne za koren repa. Miši nudi oporo na dlani ali nadlahti, hkrati pa jo ves čas omejuje z držanjem za rep. Hurst in West (2010) navajata dve alternativni metodi rokovanja, ki ne povzročata direktnega omejevanja miši s strani rokovalca. To sta novi metodi rokovanje s tunelom in metoda odprte dlani (Hurst in West, 2010).

Hurst in West (2010) sta v raziskavi so primerjala vplive vseh prej omenjenih različnih načinov rokovanja na stres in nelagodje laboratorijskih miši. V poskusu so uporabili tri najpogosteje uporabljene linije miši obeh spolov (BALB/c, C57BL/6 in ICR (CD – 1)). Pred začetkom raziskave so bile miši iz kletke v kletko prestavljane z metodo prijema za rep. Od začetka testiranja dalje pa so z mišmi rokovali samo še z metodo določeno za posamezno skupino. Rokovanje so izvajali devet dni zaporedoma. Rokovanje je bilo izvedeno vsak dan po enakem postopku. Rokovalec je z mišjo rokoval po predhodno določeni metodi dvakrat po 30 sekund. Med rokovanji je bil minut dolg odmor. Na prvi peti in deveti dan je bil izveden tudi preizkus interakcije. Preizkus interakcije so izvedli tik pred in takoj po rokovanju. Med preizkusom interakcije so ocenjevali in merili čas, ki so

ga živali preživele v interakciji z roko rokovalca. Tekom rokovanja pa so kot morebitni pokazatelj stresa beležili tudi izločanje seča in blata (Hurst in West, 2010).

Rezultati študije so potrdili predvidevanja, da je klasična metoda prijema za rep najbolj stresna za živali in povzroča nelagodje. Miši, ki so prestavljali s prijemom za rep so pokazale najmanj želje po interakciji z rokovalcem. V primerjavi z rokovanjem s tunelom ali metodo odprte dlani je bilo pri klasični metodi opaženega več uriniranja in blatenja v času rokovanja. Za najmanj stresno metodo rokovanja se je izkazalo rokovanje s tunelom. Tudi metoda rokovanja z odprto dlanjo se je izkazala za manj stresno v primerjavi s prijemom za rep, vendar pa je bilo le tu potrebno nekaj več časa za prilagoditev živali. Pri vseh treh metodah se je stopnja adaptacije na rokovalca povečevala (Hurst in West, 2010).

Gouveia in Hurst (2017) navajata dva poizkusa, ki jasno prikazujejo vpliv rokovanja na obnašanje miši. V prvem poskusu so miš, po predhodno določenem načinu rokovanja, postavili v njej neznanu okolje. Na sredino in ob rob kletke so namestili seč tuje miši. Nato so glede na izraženo raziskovalno obnašanje miši ocenili, kako močan je vpliv metode rokovanja na stres. Hkrati so ocenjevali tudi vpliv lokacije dražljaja. Eden izmed pokazateljev stresa je namreč tudi izogibanje sredini in zadrževanje ob stranicah kletke.

Ugotovili so, da je imel način rokovanja močan vpliv na splošno raziskovalno obnašanje miši med testiranjem. Miši, s katerimi so rokovali s klasično metodo prijema za rep so prikazale veliko manj aktivnega raziskovanja v primerjavi z mišmi, s katerimi so rokovali z novejšima metodama (odprta dlan in tunel). Nekatere miši, iz skupine, kjer so rokovali z mišmi po metodi prijema za rep, niso v celotnem poizkusu niti enkrat povohale seča, nastavljenega v kletki (Gouveia in Hurst, 2017).

V drugem poskusu so miši položili v kletko 10 minut pred začetkom testiranja. Zanimalo jih je namreč ali ima predhodna seznanitev s prostorom vpliv na raziskovalno obnašanje. V času navajanja na okolje v kletki ni bilo nastavljenega seča. Rezultati so pokazali, da je seznanjenost z prostorom testiranja pripomogla k izboljšanju izkazovanja raziskovalnega obnašanja tako pri skupini v kateri so z mišmi rokovali s tunelom kot pri skupini, v kateri

so z mišmi rokovali s prijemom za rep. So pa miši, s katerimi so rokovali s tunelom, pokazale močnejši odziv na predhodno seznanitev. (Gouveia in Hurst, 2017).

Dosedanja glavna ukrepa in rešitvi, ki naj bi pripomogla k zmanjševanju nelagodja v poskusih sta minimalizacija stika z živalmi med poskusom in standardizacija postopkov rokovanja. Ti rešitvi zmanjšata le število stresnih situacij medtem, ko je stres ob samem rokovanju še vedno prisoten. Za optimalno rešitev je potrebno najti način rokovanja, ki pri živali ne povzroča stresa (Gouveia in Hurst, 2013).

Klasična metoda rokovanja z laboratorijskimi mišim je prijem za rep. Kljub seznanjenosti miši z metodo in konstantnemu prestavljanju s prijemom za rep se miši prijema ne navadijo. To izkazuje tako, da ne kažejo interesa za stik z rokovalcem. Od roke raje zbežijo kot, da bi se ji približale. (Clarkson in sod, 2018).

Klasičen način rokovanja tj. prijem za rep zmanjšuje željo po prostovoljnem približevanju in povzroča izogibanje stika z rokovalcem. Med zadrževanjem miši s prijemom za rep se povečata frekvenci blatenja in uriniranja, kar je jasen pokazatelj stresa. Miši rokovane za rep izražajo tudi veliko manj raziskovalnega obnašanja (Nakamura in Suzuki, 2018).

Rokovanje z mišmi s tunelom ali na odprti dlani brez fizičnega zadrževanja sta novi metodi, ki zmanjšujeta nelagodje in spodbujata prostovoljno približevanje rokovalcu. (Mertens in sod, 2019).

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIALI

V študijo so bile vključene tri linje miši. V poskus smo vključili linije Hsd:ICR(CD-1), FLI »fat« in FHI »lean«. Miši so bile nastanjene v kletkah Techniplast blue line. Za nastilj smo uporabili mešanico žaganja in corn coba. V vseh kletkah so imele miši na voljo material za gnezdo. Prav tako so bili v vseh kletkah stalno nameščeni tuneli. V posamezni kletki so bile nastanjene po tri miši skupaj istega spola in iste linije.

V študijo je bilo vključenih šestnajst skupin živali. Šest skupin linije Hsd:ICR(CD-1) in FLI »fat« ter štiri skupini linije FHI »lean«. Samice in samci so bili v kletkah nastanjene ločeno po spolu. Miši so bile nastanjene v šestnajstih kletkah. Skupno je bilo v poskusu vključenih 48 miši; polovica samic in polovica samcev. Po linijah pa 18 miši iz linije Hsd:ICR(CD-1), 18 miši iz linije FLI »fat« ter 12 miši iz linije FHI »lean«.

#### 3.2. METODE

Rokovanje smo izvajali devet dni zaporedoma. Prvi, peti in deveti dan smo izvedli tudi interakcijo. V študiji so sodelovale tri osebe z različnimi izkušnjami pri delu z laboratorijskimi mišmi. Prvi rokovalac je bil v vsakodnevnem stiku z mišim, drugi rokovalac v občasnem, tretji rokovalac je bil brez izkušenj pri delu z laboratorijskimi mišmi. S tem smo poskušali čim bolj izločit vpliv izkušenosti rokovalca na obnašanje živali. Rokovanje smo izvajali vsak dan v dopoldanskem času. Pri linijah Hsd:ICR(CD-1) in FLI »fat« smo poskus izvedli tako, da smo rokovali z vsemi tremi različnimi metodami, pri liniji FHI »lean« pa le z dvema – tunel in prijem za rep. Metoda rokovanja je bila določena za vsako kletko s po 3 mišmi in ves čas poskusa je bila metoda rokovanja za posamezno kletko ista. Živali so bile razdeljene glede na metodo rokovanja tako, da so bile živali razdeljene enakomerno na metodo rokovanja in spol.

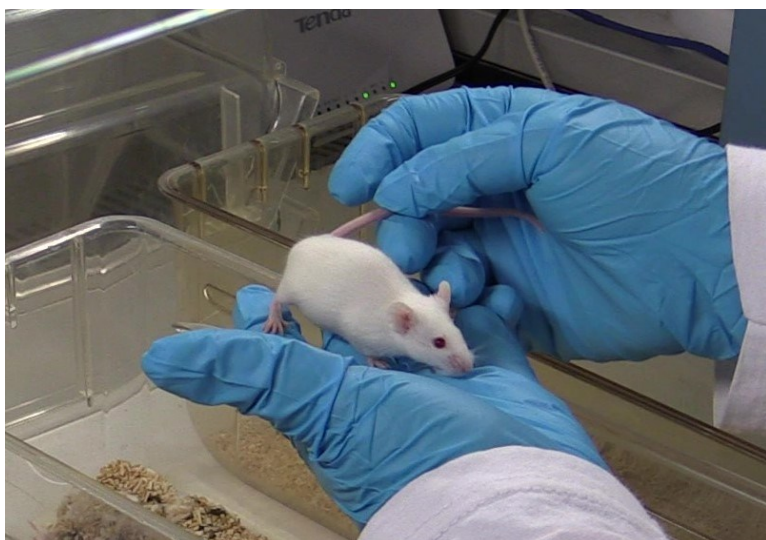
Vsa rokovanja so bila posneta z dvema kamerama, kar je omogočalo natančno meritev časa, ki so ga miši preživele v interakciji z rokovalcem. Vedno, ko je rokovalec zaključil rokovanje v eni kletki in predno je začel rokovati z živalmi v naslednji kletki, si je razkužil roke in počakal, da so se rokavice posušile. Pred rokovanjem z nasprotnim spolom pa si je rokovalec zamenjal tudi rokavice.

### **3.2.1. Postopek rokovanja**

Rokovanje je bilo izvajano devet dni zaporedoma vsakič po identičnem postopku. Kletko smo odprli in odstranili material za gnezdo ter tunel. Nato smo izvedli za skupino določen način rokovanja. Miš smo zadržali nad kletko 30 sekund in jo prestavili v novo kletko enako še za ostali dve živali v kletki. Sledil je premor eno minuto, ko je rokovalec stal mirno in v tišini pred kletko. Potem smo postopek rokovanja ponovili. Vsako miš iz kletke smo na njej določen način rokovanja vzeli iz kletke, jo zadrževali 30 sekund nad kletko in potem ponovno spustili v prvotno kletko. Enako še za ostali dve miši v kletki. Po končanem rokovanju smo v kletko vrnili tunel in material za gnezdo ter kletko zaprli. Uporabljene so bile tri različne metode rokovanja. Klasična metoda prijema za rep in novi metodi rokovanja s tunelom in rokovanje z odprto dlanjo.

#### **3.2.1.1. Metoda prijema za rep**

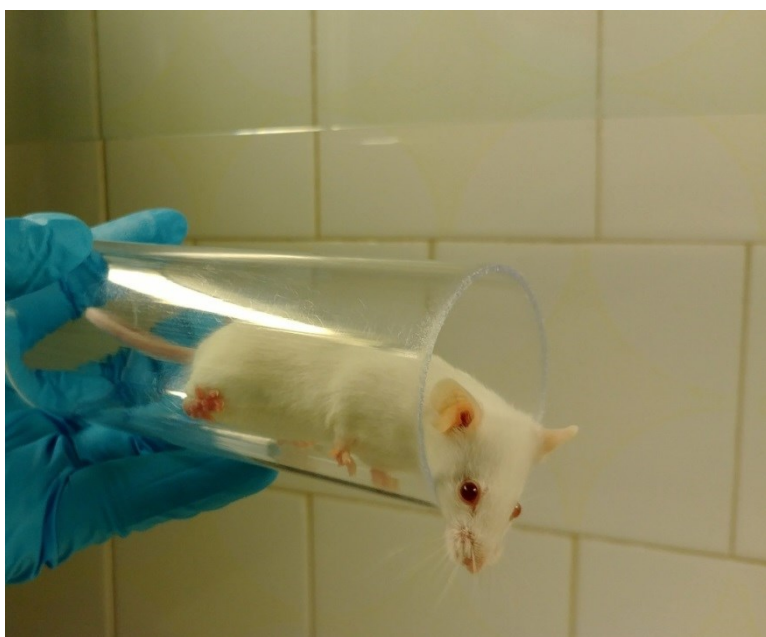
Pri prijemu za rep smo miši prijeli za rep, ob korenu, jo dvignili in položili na dlan ali rokav. Na dlani smo jo zadrževali 30 sekund, ves čas pa jo držali za rep kot je videti na sliki 1. Nato smo miš z dvigom za rep položili nazaj v kletko.



Slika 1: Prijem za rep

### 3.2.1.2. Metoda rokovanja s tunelom

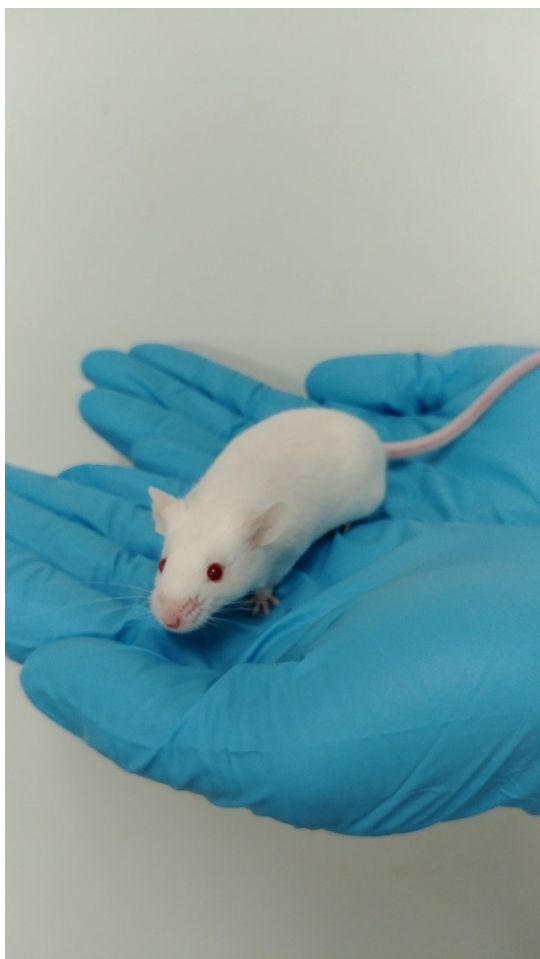
Pri rokovanju s tunelom smo uporabili tunel iz kletke, na katerega so bile miši navajene. Tunel je rokovalec postavili ob stranico kletke nato pa z nežnim vodenjem miš pripeljal v tunel. Tunel z mišjo je rokovalec vzdignil nad kletko (slika 2), ga zadržal 30 sekund nato pa miš ritensko spustil nazaj v kletko. Na začetku smo imeli roke ohlapno prek koncev tunela, sčasoma pa to ni bilo več potrebno.



Slika 2: Rokovanje s tunelom

### 3.2.1.3. Metoda z odprto dlanjo

Pri rokovanju z odprto dlanjo je rokovalec miš vzel iz kletke, tako da jo je vodil v kot kletke in podstavil roko. Ko je imel miš na dlani je počasi dvignil roke nad kletko. Miš je pustil 30 sekund, da se prosto sprehaja po roki (slika 3), nato jo je spustil nazaj v kletko. Pri začetnih rokovanjih smo z drugo roko nežno pokrili dlan, da so se miši navadile potem pa to ni bilo več potrebno.



Slika 3: Odprta dlan

### 3.2.2. Postopek in merjenje interakcije

Interakcija je bila izvedena na prvi, peti in zadnji dan študije. Preizkus interakcije je rokovalec opravil najprej tik pred nato pa še takoj po rokovanju. Kletko smo odprli in odstranili tunel in material za gnezdo. Pred začetkom preizkusa interakcije je rokovalec



pred odprto kletko mirno in v tišini čakal 60 sekund. Za tem je rokovalec počasi položil roko v sprednji del kletke. Pri skupinah, kjer smo rokovali s tunelom je rokovalec v kletko položil roko v kateri je držal tunel. Čas merjenja interakcije je trajal 60 sekund. Rokovalec je nato odstranil roko iz kletke se postavil pred kletko in ponovno mirno čakal 60 sekund. Sledilo je rokovanje, izvedeno po za kletko določeni metodi. Po rokovanju je rokovalec ponovno pred kletko mirno počakal 60 sekund. Nato pa spet položil roko za 60 sekund v sprednji del kletke in tako opravil še preizkus interakcije po rokovanju.

Do rezultatov smo prišli s štetjem in merjenjem interakcij. Ocenjevali smo koliko časa se miš nahaja v sprednjem delu kletke v bližini rok in koliko časa je miš v tesnem kontaktu z roko. Opazovali in beležili smo vohanje, dotikanje s tačkami, plezanje na ali pod roko in žvečenje rokavice. Interakcije so bile posnete s kamero. To je omogočalo natančno meritev časa, ki so ga miši preživele v kontaktu z roko ali tunelom. S pomočjo posnetkov smo izmerili čas interakcije za vsako žival v kletki. Trajanja interakcij smo nato sešteli. Za analize in primerjave med različnimi načini rokovanja smo uporabljali vsoto časa in števil interakcij vseh živali v kletki, ter deleže časa. Za vsako metodo rokovanja smo izračunali tudi povprečno število interakcij in povprečni čas interakcije pred in po rokovanju.

#### 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za oceno vpliva metode rokovanja na nelagodje, smo primerjali število in čas interakcij pred rokovanjem glede na število in čas interakcij po rokovanju. Kot je prikazano v preglednici 1 sta se pri vseh metodah povečala tako povprečni čas kot povprečno število interakcij izmerjenih po rokovanju, glede na povprečna čas in število interakcij izmerjenih pred rokovanjem. Le pri metodi rokovanja s tunelom se je pri zadnji interakciji zmanjšalo število za 1 interakcijo po rokovanju, glede na čas interakcij in število interakcij pred rokovanjem. V raziskavi Hurst in West (2010) je bil prav tako zaznan trend povečevanja časa interakcije po rokovanju glede na čas interakcije pred rokovanjem.

Preglednica 1: Povprečno število in čas (s) interakcij pred in po rokovanju prvi, peti in deveti dan poskusa.

	1. interakcija				2. interakcija				3. interakcija			
	PRED		PO		PRED		PO		PRED		PO	
	čas*	število**	čas	število	čas	število	čas	število	čas	število	čas	število
REP	15	9	44	13	45	10	60	10	74	21	86	25
TUNEL	17	9	39	15	54	10	61	13	111	20	153	19
DLAN	10	10	49	11	63	14	91	14	99	24	98	35

\* povprečen čas interakcije skupine živali rokovane z določeno metodo.

\*\* povprečno število interakcij skupine živali rokovane z določeno metodo.

V študiji Hurst in West (2010) je mogoče opaziti izrazito izstopanje večjih vrednosti časa interakcije pri rokovanju s tunelom, kar smo zasledili tudi pri naših rezultatih. Tudi povprečen čas interakcij je pri metodi s tunelom opazno večji, kot pri ostalih dveh metodah. Toda Hurst in West (2010) opažata, da potrebujejo miši več časa, da se navadijo rokovanja z odprto dlanjo, kar je opazno tudi v naši študiji, saj je povprečno trajanje interakcije manjše v primerjavi z metodo s tunelom, a vseeno večje kot pri metodi prijema za rep.

Preglednica 2: Povprečni delež (%) časa interakcije pred in po rokovanju glede na metodo rokovanja.

	1. interakcija		2. interakcija		3. interakcija	
	delež časa (%)*		delež časa (%)		delež časa (%)	
	PRED	PO	PRED	PO	PRED	PO
REP	8,06	24,26	24,81	36,67	45,93	53,01
TUNEL	9,26	21,39	30,00	50,09	61,85	84,72
DLAN	7,50	26,94	34,72	39,44	55,00	54,17

\* povprečni delež časa, ki ga je posamezna skupina živali preživela v interakciji z rokovalcem; seštevek časa interakcije za vse tri živali v kletki, 100% predstavlja 180s (60s za vsako žival)

Deleži časa interakcij pred rokovanji so pri vseh merjenjih interakcij manjši kot deleži časa interakcij po rokovanjih. Kot je prikazano v preglednici 2 se je le pri metodi odprte dlani pri zadnjem merjenju interakcije delež časa interakcije po rokovanju zmanjšal za 0,83% glede na delež časa interakcije pred rokovanjem, kar je zanemarljivo. Pri vseh metodah rokovanja so se deleži časa interakcij z vsakim preizkusom interakcije povečevali. To pomeni, da se miši privadijo vsakega načina rokovanja, kadar le tega konstantno izvajamo. Povečanje pri metodi odprte dlani je le malo bolj izrazito glede na metodo prijema za rep. Hurst in West (2010) pa sta v svoji raziskavi pridobili večje razlike v rezultatih med posameznimi metodami. V raziskavi Hurst in West (2010) delež interakcije pri skupini rokovanj za rep nikoli ne preseže deleža interakcije skupin pri drugih dveh metodah. Skupine miši, s katerimi smo rokovali s tunelom so pri vmesni (50,09%) in zadnji (84,72%) interakciji po rokovanju dosegle najvišje povprečni delež časa. Rezultati postavljajo metodo s tunelom glede na odziv miši, najbolj prijazno metodo rokovanja. Nižje vrednosti pri metodi prijema za rep ponazarjajo nekaj nelagodja miši ob tem načinu rokovanja. Višje vrednosti pri metodah rokovanja s tunelom pa lahko obrazložimo z več zanimanja miši za stik z rokovalcem. Tudi Hurst in West (2010) navajata enak vrstni red priljubljenosti metod glede na odzive miši.

#### 4.1. POVPREČNO TRAJANJE ENE INTERAKCIJE

Pri nekaterih skupinah se pojavlja trend velikega števila interakcij v primerjavi z majhnim deležem časa interakcije. Primerjavo lahko najbolje prikažemo z izračunom povprečnega trajanja ene interakcije.

Preglednica 3: Povprečno trajanje (s) ene interakcije pred in po rokovanju.

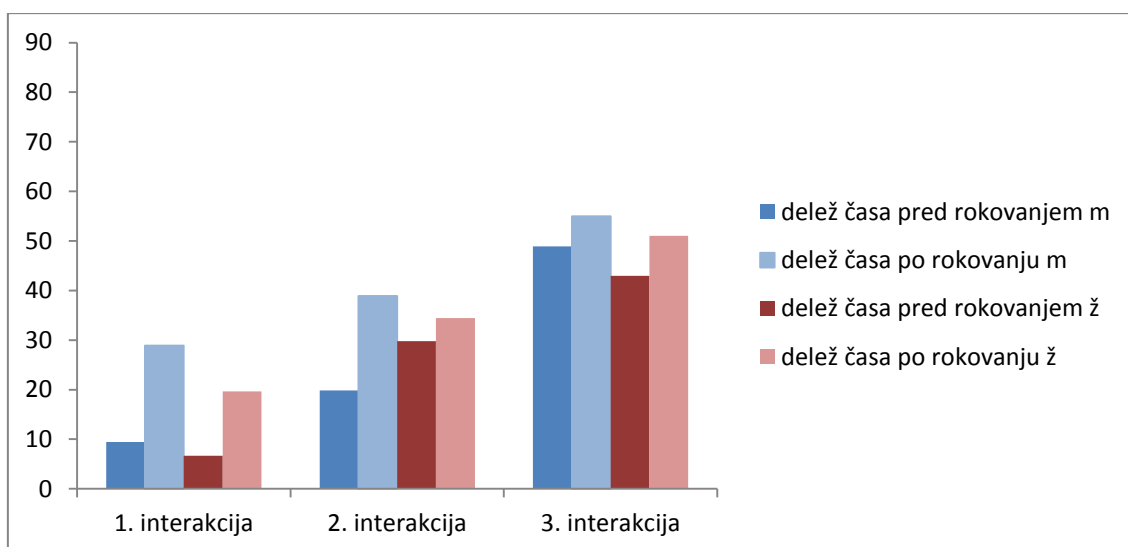
	1. interakcija		2. interakcija		3. interakcija	
	PRED	PO	PRED	PO	PRED	PO
REP	1,23*	3,55	4,13	5,9	4,5	3,99
TUNEL	1,58	2,9	4,38	4,91	5,33	7,56
DLAN	1,95	3,32	5,73	6,48	3,67	3,09

\* povprečno trajanje ene interakcije je izraženo v sekundah.

Kot je razvidno iz preglednice 3 je povprečno trajanje ene interakcije pri vseh metodah večje pri merjenju interakcije po rokovanju glede na merjenje pred rokovanjem, le pri zadnji interakciji se je povprečno trajanje interakcije po rokovanju pri metodah prijema za rep in na odprti dlani skrajšalo glede na povprečno trajanje interakcije pred rokovanje. Vendar to zmanjšanje ni bilo izrazito, za 0,51 s pri prijemu za rep in 0,58 s pri metodi odprte dlani. Najdaljši povprečni čas so dosegle skupine rokovane s tunelom. Kar potrjuje ugotovitve Hurst in West (2010), da interakcija s tunelom mišim povzroča najmanj strahu, stresa in nelagodja. Pri zadnji interakciji so v povprečju ostale v interakciji z roko ali tunelom 7,56 sekund naenkrat. Kljub temu, da so se povprečni čas in število interakcij ter deleži časov povečevali z vsakim naslednjim merjenjem interakcij, pa je iz preglednice 3 razvidno, da pri povprečnem trajanju ene interakcije trend povečevanja drži samo pri metodi tunel. To ponovno potrjuje, da se miši pri rokovanju z tunelom občutijo manj stresa kot pri prijemu za rep ali pri rokovanju z odprto dlanjo. Iz preglednice 3 je razvidno, da je povprečen čas interakcije pri metodi odprte dlani najkrajši. Glede na to, da je čas interakcij pri metodi odprte dlani večji kot pri prijemu za rep lahko sklepamo, da gre za več krajših interakcij. Kar pomeni, da miši izkazujejo interes po stiku z dlanjo oziroma rokovalcem. Hkrati pa tudi, da je za seznanjenost miši z rokovalcem potrebno nekoliko več časa, kot pri metodi tunel. Kot sta v svoji raziskavi predvideli tudi Gouveia in Hurst (2017).

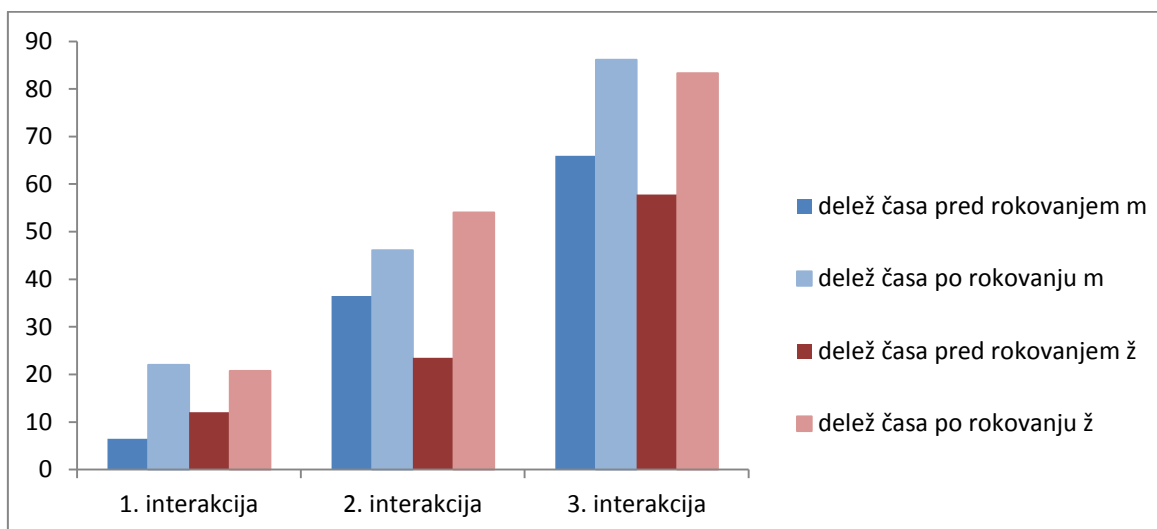
## 4.2. VPLIV SPOLA

Iz grafov (slika 4, 5 in 6) je razvidno da so se deleži časa interakcij po rokovanjem tako pri moškem kot ženskem spolu pri vseh interakcijah povečali glede na deleže časa interakcij pred rokovanjem. Le pri metodi odprte dlani smo opazili nekoliko krajši čas interakcije pri samcih, pri drugi interakciji (5. dan) in pri samicah pri tretji interakciji (9. dan). Predpostavljamo, da sta ta rezultata zgolj naključna in predvsem rezultat uporabljenega majhnega števila živali. Glede na pridobljene rezultate vpliv spola ni opazen pri nobeni izmed metod rokovanja.



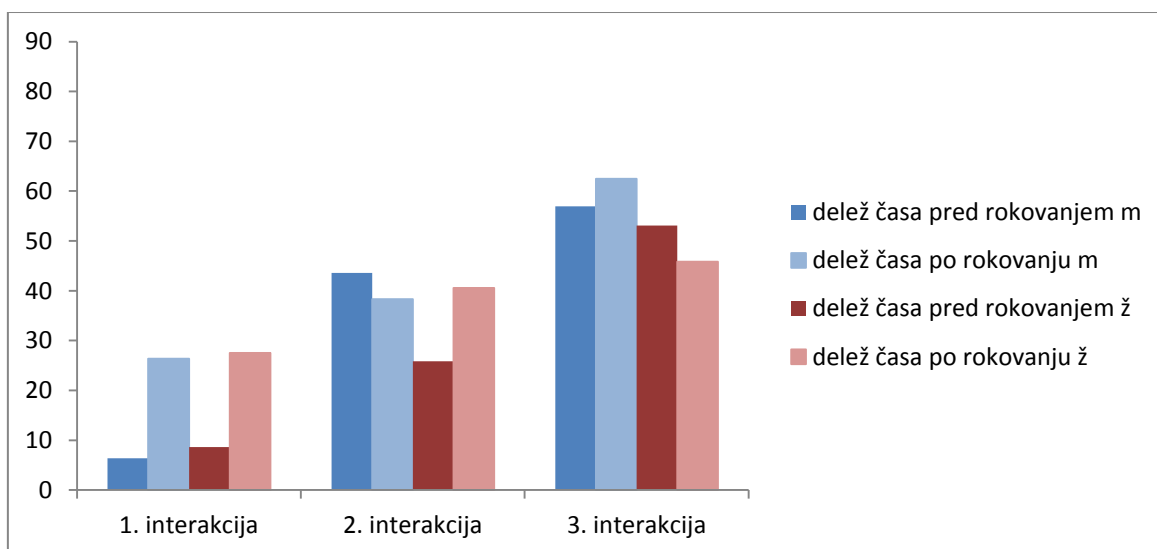
\*m – moški spol; ž – ženski spol

Slika 4: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi rep.



\*m – moški spol; ž – ženski spol

Slika 5: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi tunel.



\*m – moški spol; ž – ženski spol

Slika 6: Delež časa interakcije glede na spol pri metodi dlan.

Tudi v študiji Hurst in West (2010) opazne razlike med spoloma ni bilo. Do odstopanj rezultatov je prišlo le pri eni izmed skupin, ki so bile rokovane z metodo odprte dlani. In sicer je skupina samic pokazala večji interes po interakciji z rokovalcem.

### 4.3. VPLIV LINIJE

Linije smo primerjali med seboj tako, da smo za vsako linijo sešteli vrednosti vseh treh metod rokovanja nato pa izračunali povprečen čas in povprečno število interakcij pred in po rokovanju za posamezno linijo.

Preglednica 4: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 1. interakciji glede na linijo.

linija	Čas pred (s)	Število pred	Čas po (s)	Število po
FHI »lean«	12	5	25	11
FLI »fat«	18	11	83	18
Hsd:ICR(CD-1)	12	10	15	10

V preglednici 4 pri liniji FLI »fat« pri merjenju interakcije po rokovanju opazimo majhno število interakcij glede na dolžino časa interakcij. Razlika v vrednostih znaša kar 65. To nam pove, da je povprečno trajanje ene interakcije pri liniji FLI »fat« daljše, kot povprečno trajanje ene interakcije pri linijah FHI »lean« in Hsd:ICR(CD-1), kjer so razlike med povprečnim časom in številom manjše. Pri liniji FHI »lean« je vrednost razlike 14 pri liniji Hsd:ICR(CD-1) pa zgolj 5. Rezultat potrjuje, da ima linija FLI »fat« največ interesa po kontaktu z oskrbovalcem in najboljše karakteristike za hitro prilagoditev.

Preglednica 5: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 2. interakciji glede na linijo.

linija	Čas pred (s)	Število pred	Čas po (s)	Število po
FHI »lean«	9	6	48	10
FLI »fat«	97	15	119	16
Hsd:ICR(CD-1)	37	10	41	11

Kot je razvidno iz preglednice 5 se tudi pri drugi interakciji nadaljuje trend dolgo trajajočih interakcij pri liniji FLI »fat«. Podaljšale so se tudi interakcije pri linijah FHI »lean« in Hsd:ICR(CD-1). In sicer so se razlike v vrednostih povečale pri liniji FHI »lean« na vrednost 38 in pri liniji Hsd:ICR(CD-1) na vrednost 30.

Preglednica 6: Povprečje časa in števila pred in po rokovanju pri 3. interakciji glede na linijo.

linija	Čas pred (s)	Število pred	Čas po (s)	Število po
FHI »lean«	66	15	122	17
FLI »fat«	147	25	150	32
Hsd:ICR(CD-1)	61	22	73	25

V preglednici 6, ki prikazuje zadnjo interakcijo pa tudi pri liniji FHI »lean« opazimo daljši čas ene interakcije. Medtem ko pri liniji Hsd:ICR(CD-1) ta čas počasneje narašča. Iz rezultatov lahko presodimo, da liniji FHI »lean« in FLI »fat« hitreje zaupata rokovalcu in dlje časa vztrajata z njim v interakciji. Razlika med linijama je, da linija FLI »fat« pokaže več interesa in manj strahu že pred rokovanjem, medtem ko je linija FHI »lean« pred rokovanjem vedno bolj zadržana. Po rokovanju pa se predvsem čas zadrževanja pri rokovalcu poveča za dvakrat, število pa ne, kar pomeni daljše zadrževanje pri roki ob enkratni interakciji.

Pri vseh linijah so se deleži časa interakcije po rokovanju povečali glede na deleže časa interakcije pred rokovanjem. Prav tako so se povečevali deleži časa interakcije pri vsakem naslednjem preverjanju interakcije. Najbolj izrazito je povečanje deležev časa interakcije pri liniji FLI »fat«, sledi ji linija FHI »lean«. Najmanj pa so se povečali deleži časa interakcije pri liniji Hsd:ICR(CD-1).

V poskusu, ki sta ga izvedli Hurst in West (2010) je bila prav tako uporabljena linija Hsd:ICR(CD-1). V primerjavi z našimi rezultati so imele njihove Hsd:ICR(CD-1) miši v poskusu večji delež časa interakcije pri metodi rokovanja s tunelom. Delež časa interakcije, pri metodi z odprto dlanjo in pri prijemu za rep, pa je primerljiv z našimi rezultati. Eden izmed možnih vplivov na razlike v rezultatih je to, da sta Hurst in West (2010) izvajali rokovanje in meritve interakcij ponoči, ko so miši po naravi aktivne. Mi pa smo rokovanje izvajali podnevi.



## 5 SKLEPI

Rezultate, ki smo jih pridobili, lahko strnemo v naslednje sklepe:

- Povprečen čas in povprečno število interakcij sta se povečevala pri vseh metodah rokovanja pri vsakem naslednjem preverjanju interakcij. Povečanje je bilo najbolj izrazito pri metodi rokovanja s tunelom, sledi dlan in na zadnjem mestu prijem za rep.
- Deleži časa interakcije so bili po rokovanju večji kot pred rokovanjem. Povečanje časa preživetega v interakciji z rokovalcem je bilo najbolj izrazito pri metodi tunel, sledi dlan in nato prijem za rep.
- Povprečno trajanje ene interakcije se je tekom poskusa povečevalo le pri metodi rokovanja s tunelom. Tako pri prijemu za rep kot pri metodi odprte dlani, se je povprečen čas trajanja ene interakcije znižal.
- Pri nobenem izmed načinov rokovanja ni bilo mogoče zaznati vpliva spola na delež časa preživetega v interakciji z rokovalcem.
- Zaznati je bilo možno vpliv linije na adaptacijo rokovanja. Najhitreje so se privadile miši linije FLI »fat«. Liniji FHI »lean« in Hsd:ICR(CD-1) pa sta se izkazali za nekoliko bolj zadržani.
- Rokovanje s tunelom in odprto dlanjo povzročata manj nelagodja in strahu kot prijem za rep ter spodbudita več prostovoljnega približevanje rokovalcu, posledično tudi zadrževanje za miši ne povzroča nelagodja.

## 6 VIRI

- Clarkson J. M., Dwyer D. M., Flecknell P. A., Leach M. C., Rowe C. 2018. Handling method alters the hedonic value of reward in laboratory mice. *Scientific Reports*, 8, 2448: doi:10.1038/s41598-018-20716-3: 8 str.
- Gouveia K., Hurst J. L. 2013. Reducing mouse anxiety during handling: Effect of experience with handling tunnels. *PLoS ONE*, 8, 6: e66401. doi:10.1371/journal.pone.0066401: 8 str.
- Gouveia K., Hurst J. L. 2017. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Scientific Reports*, 7: 44999: doi:10.1038/srep44999: 12.str.
- Hurst J. L., West R.S. 2010. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*, 7: 825 – 826
- Mertens S., Vogt M. A., Gass P., Palme R., Hiebl B., Chourbaji S. 2019. Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrl mice. *PLOS ONE*, 14, 4: e0215367. doi:10.1371/journal.pone.0215367: 3 str.
- Miller A. L., Leach M.C. 2015. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. *Laboratory Animals*, 50, 4: 305 – 307
- Nakamura Y., Suzuki K. 2018. Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80, 6: 886-892
- Novak J., Bailoo J. D., Melotti L., Rommen J., Wurbel H. 2015. An exploration based cognitive bias test for mice: effects of handling method and stereotypic behaviour. *PLoS ONE*, 10, 7: e0130718. doi:10.1371/journal.pone.0130718: 16 str.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Tatjani Pirman za dosegljivost in odzivnost, za strokovno pomoč, vodenje, vse nasvete in veliko potrpežljivosti ob pisanju diplomske naloge.

Zahvala Katji Skulj, dr. vet. med., za idejo in vso pomoč tako pri izvedbi praktičnega dela kot pri samem pisanju naloge.

Zahvala tudi vodji Centra za laboratorijske živali prof. dr. Simonu Horvatu, da mi je omogočil izvedbo praktičnega dela diplomske naloge.

Hvala za čas, ki ste mi ga namenili!