

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie



VÝUKOVÁ OPORA  
PRO PŘEDMĚT

WELFARE POKUSNÝCH ZVÍŘAT A  
POKUSY NA ZVÍŘATECH  
(H6WV)



**Lenka Večerková**  
**Martin Hostovský**

*Tato výuková opora byla financována*  
Interní vzdělávací agenturou VFU Brno - IVA  
2017FVHE/2390/65

## Obsah

1	ÚVOD .....	3
2	ALTERNATIVNÍ METODY K TESTOVÁNÍ NA ZVÍŘATECH .....	4
2.1	TEST OECD 236 – EMBRYONÁLNÍ TEST TOXICITY .....	8
2.1.1	PRINCIP TESTU .....	8
2.1.2	PLATNOST (VALIDITA) TESTU.....	9
2.1.3	Potřebné vybavení a zařízení pro provedení testu.....	9
2.1.4	VLASTNÍ PROVEDENÍ A POSTUP TESTU .....	12
2.2	POUŽITÍ ARTEMIÍ (ŽÁBRONOŽEK) V ALTERNATIVNÍCH TESTECH .....	22
2.2.1	LÍHNUTÍ VAJÍČEK/CYST .....	23
2.2.2	ZÁKLADNÍ TEST .....	24
2.2.3	PRACOVNÍ POSTUP.....	25
3	OBOHACENÍ CHOVU POKUSNÝCH ZVÍŘAT .....	28
3.1	DOPLŇKOVÉ STUDIJNÍ MATERIÁLY PRO OBOHACENÍ VYBRANÝCH SKUPIN POKUSNÝCH ZVÍŘAT <sup>30</sup>	
3.1.1	OBOHACENÍ U POKUSNÝCH ZVÍŘAT Z POHLEDU WELFARE POKUSNÝCH HLODAVCŮ, KRÁLÍKŮ, FRETEK A SUBHUMÁNNÍCH PRIMÁTŮ.....	30
3.1.2	OBOHACENÍ Z HLEDISKA WELFARE VYBRANÝCH DRUHŮ POKUSNÝCH HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT .....	42
4	OBRAZOVÁ PŘÍLOHA ( <i>Zmenšena</i> ) .....	55
4.1	OBOHACENÍ WELFARE POKUSNÝCH HLODAVCŮ .....	56
4.1.1	DOMKY PRO KRÁLÍKY HLODAVCE Z PEVNÝCH MATERIÁLŮ .....	56
4.1.2	JEDNORÁZOVÉ DOMKY PRO HLODAVCE .....	59
4.1.3	HNÍZDNÍ MATERIÁLY PRO HLODAVCE.....	60
4.1.4	PŘEDMĚTY NA OKUSOVÁNÍ.....	61
4.2	OBOHACENÍ WELFARE POKUSNÝCH OBOJŽIVELNÍKŮ .....	62
4.3	PŘÍKLADY ZAŘÍZENÍ PRO CHOV POKUSNÝCH ZVÍŘAT .....	64
5	POZNÁMKY K PŘEDNÁŠKÁM Z PŘEDMĚTU WELFARE POKUSNÝCH ZVÍŘAT A POKUSY NA ZVÍŘATECH (H6WV) .....	66

## **Poděkování**

*Autoři projektu tímto děkují Mgr. Lucii Plhalové, Ph.D., Mgr. Pavle Sehonové a Mgr. Michalovi Žďárskému, Ph.D. za významnou pomoc při zpracovávání metodik alternativních testů k pokusům na zvířatech, při fotografování a konečné úpravě materiálů. Zároveň autoři rovněž děkují Interní vzdělávací agentuře IVA VFU Brno za poskytnutí finanční podpory.*

# 1 ÚVOD

Cílem tohoto projektu bylo vytvoření praktických výukových materiálů pro předmět Welfare pokusných zvířat a pokusy na zvířatech, které budou po obhájení projektu oporou pro studenty a napomohou k efektivnějšímu praktickému vzdělávacímu procesu pregraduálních studentů.

Předmět Welfare pokusných zvířat a pokusy na zvířatech (H6WV) je určen pro studenty VFU Brno ve studijním oboru Ochrana zvířat a welfare a zahrnuje přednášky a praktická cvičení. V rámci praktických cvičení studenti získávají znalosti i dovednosti v oblasti ochrany pokusných zvířat. Projekt doplňuje stávající materiály, inovuje praktickou výuku a je tak nezbytnou součástí moderních přístupů ke vzdělávání studentů.

Vypracované výukové texty a návody budou doplňujícím materiálem do praktických cvičení předmětu Welfare pokusných zvířat a pokusy na zvířatech. Studenti budou texty využívat přímo na cvičeních a rovněž budou k dispozici ke stažení na stránkách Ústavu ochrany zvířat, welfare a etologie a serveru Vefis VFU Brno.

*„Otázkou není, zda dokáží myslet, ani zda dokáží mluvit, ale zda jsou schopna trpět.“*

➤ **Jeremy Bentham (1748-1832)**

## 2 ALTERNATIVNÍ METODY K TESTOVÁNÍ NA ZVÍŘATECH

Vývoj alternativních metod pro užití zvířat navrhli Russell a Burch (William Russell a Rex Burch, 1959: The Principles of Humane Experimental Technique) jako koncepci tří „R“:

- ✓ REPLACEMENT – nahrazení zvířat v pokusech pokud dosažený výsledek je na stejné nebo vyšší úrovni (je-li to možné)
  - ✓ REDUCTION – snížení počtu zvířat výběrem vhodných metod, uspořádáním pokusu, péčí o kvalitu zvířat, atd.
  - ✓ REFINEMENT – snížení či úplné vyloučení bolestivých a stresujících experimentálních přístupů a postupů
- 
- cílem je zabránění/snížení používání zvířat v pokusech
  - poskytují alternativní cesty pro testování látek a jejich účinků na různých úrovních
  - další výhody - časová efektivita, menší náročnost na pracovní sílu, efektivita nákladů
  - k testování na zvířatech byly navrženy různé alternativy, které překonávají nevýhody spojené s pokusy a současně naplňují etické požadavky společnosti
- zásady nahrazení a omezení používání zvířat a šetrného zacházení = přísná priorita požadavku na používání alternativních metod
  - pokud neexistuje žádná alternativní metoda uznaná právními předpisy Unie, lze počet zvířat snížit uplatněním jiných metod

### Zakotveno i v legislativě

Legislativa EU

**SMĚRNICE RADY (86/609/EHS) o sblížení právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely:**

Článek 7

2. Pokus nesmí být proveden, je-li pro dosažení žádaného výsledku k dispozici vědecky vyhovující, **zastupitelná a proveditelná alternativa**, při které nemusí být použito zvíře.

### Článek 23

1. Komise a členské státy **by měly podporovat vývoj a uznání alternativních technik**, které mohou poskytnout výsledky srovnatelné s pokusy na zvířatech, ale vyžadují méně zvířat a jsou spojeny s menší bolestí, a mají učinit další, podle jejich názoru vhodná opatření, pro podporu bádání v této oblasti. Komise a členské státy mají sledovat vývojové tendence týkající se pokusných metod.

### **Zákon 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů**

#### § 16g

##### Alternativní přístupy a kontaktní místo

- (1) Kontaktní místo, které poskytuje poradenství ohledně právní závažnosti a vhodnosti alternativních přístupů navrhovaných k validaci, uveřejňuje ministerstvo rovněž ve Věstníku.
- (2) Kontaktní místo uvedené v odstavci 1 poskytuje bezplatně státním orgánům příslušným ke schvalování projektů pokusů a za úplatu odborným komisím podle § 15g poradenství ohledně právní závažnosti a vhodnosti alternativních přístupů navrhovaných k validaci

### **Projekt pokusů**

#### **Bod č. 7:**

- ✓ Prohlášení žadatele o průkazu nezbytnosti pokusů nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusů ukládá, včetně zdůvodnění, **proč nelze pokus na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami**

#### **Bod č. 11**

- ✓ Uplatnění metod v zájmu nahrazení a omezení používání pokusných zvířat a šetrného zacházení s nimi (3R)

### **Nahrazení zvířat**

- ✓ Proč je nezbytné pro dosažení cílů projektu pokusu použití zvířat?
- ✓ Jaké alternativní metody byly zváženy a proč není jejich využití možné?
- ✓ Jaké alternativní metody budou použity pro dosažení vašich cílů?

- ✓ Existuje alternativní metoda (bez použití zvířat) se stejnou spolehlivostí pro tento pokus?

### **Validace alternativních metod**

= proces ověřování správnosti a použitelnosti alternativní metody

- ✓ validace zajišťuje, že alternativní metody budou vědecky platné
- ✓ přijatelnost pro regulační orgány (klasifikace a označování látek, schválení výrobku nebo testování bezpečnosti)
- ✓ Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD)
- ✓ FAO, WHO, EPA...
- ✓ Metody po validaci aplikovány v mnoha procesech:
- ✓ REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals)
- ✓ Směrnice 76/768/EEC (novely 2009/129/ES) „směrnice o kosmetických prostředcích“
- ✓ Classification and Labelling of Chemicals and Transport regulations

### **Evropské středisko pro validaci alternativních metod**

= politické opatření v rámci Společného výzkumného střediska Komise, koordinuje validaci alternativních přístupů v Unii od roku 1991

- Musí projít validačním řízením
  - ✓ ECVAM (Evropské středisko pro validaci alternativních metod, EU)
  - ✓ ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods, USA)
  - ✓ každá nová alternativní metoda - revidována panelem odborníků
  - ✓ po určitou dobu mohou být používány obě metody (stará i nová)

### **Alternativy k testování na zvířatech**

*In silico* modely

- odhadují vlastnosti chemických látek na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností a podobnosti s jinými chemikáliemi se známým účinkem (např. QSAR)

- rychlé, relativně levné, ale mají omezení v předpovědi LC50 pro chemikálie s neznámými nebo specifickými způsoby působení

#### *In vitro* modely

- používají buněčné linie nebo bakteriální testy
- rychlé a velmi dobré při zkoumání konkrétního způsobu působení chemické látky
- postrádají složitost celého organismu

#### *Ex vivo* modely

- používají části těla z ordinací nebo jatek a zahrnují například testy propustnosti s lidskou pokožkou nebo *ex vivo* testy podráždění očí

Vývoj alternativních metod experimentování na zvířatech za posledních 20 let rychle rostl. Dnes mají *in vitro* a *silico* metody významnou úlohu při identifikaci nebezpečnosti a hodnocení toxikologického profilu sloučenin. Pokrokové alternativní metody a jejich kombinace se také používají pro hodnocení bezpečnosti konečných produktů. Několik alternativních metod, které byly vědecky ověřeny a přijaty příslušnými regulačními orgány, lze použít pro regulační toxikologické účely, čímž se v toxikologických experimentech sníží nebo zcela nahradí živá zvířata. Přijetí alternativních metod jako hodnotných nástrojů moderní toxikologie bylo uznáno regulátory, včetně OECD, FDA a EPA.



## 2.1 TEST OECD 236 – EMBRYONÁLNÍ TEST TOXICITY

Test s dáním pruhovaným (*Danio rerio*) je určen ke stanovení akutní toxicity chemických látek jako alternativa testu OECD 203. Provádí se na embryonálních stádiích ryb v mikrotitračních deskách. Test byl úspěšně aplikován na širokou škálu látek vykazujících různé způsoby působení, rozpustnost, těkavost a hydrofobicitu.

Embryonální test toxicity (FET) byl vyvinut hlavně pro použití s dáním pruhovaným (*Danio rerio*), ale metoda testu může být rovněž přizpůsobena jelečkovi velkohlavému (*Pimephales promelas*) nebo medace (*Oryzias latipes*). Pomocí metody embryonálního testu toxicity lze definovat letální účinky chemických látek na embryonálních stádiích ryb a představuje tak alternativní zkušební metodu pro testy akutní toxicity u mladých či dospělých ryb. Naplňuje tak pokyny a požadavek OECD pro uplatňování koncepce 3R v testování chemických látek.

### 2.1.1 PRINCIP TESTU

Jikry dána pruhovaného (*Danio rerio*) jsou exponovány testované chemické látky v různých koncentracích v mikrotitračních deskách s 24 jamkami. Test se zahajuje bezprostředně po oplodnění jiker a pokračuje po dobu 24, 48 až 96 hodin. Letální účinky látek jsou určeny porovnáním s kontrolními skupinami (neexponované jikry) pro určení hodnot LC<sub>50</sub>, NOEC a LOEC. Zkušební metoda je založena na použití minimálně pěti testovaných koncentrací a vhodných kontrol s deseti embryi v jednotlivých jamkách. Každá látka by měla být zkoušena paralelně ve dvou až třech nezávislých opakováních.

Každých 24 hodin se zaznamenávají až čtyři indikátory:

- ✓ koagulace jiker
- ✓ absence tvorby somitů
- ✓ neoddělení ocasu
- ✓ absence srdečního tepu

Na konci expozice se akutní toxicita stanoví na základě pozitivního výsledku v kterémkoli ze čtyř zaznamenaných pozorování a vypočte se hodnota LC<sub>50</sub>, NOEC a LOEC

## 2.1.2 PLATNOST (VALIDITA) TESTU

Pro to, aby byly výsledky zkoušek platné, musí být splněna následující kritéria:

- 1) Celková míra oplození všech shromážděných jiker by měla být v testované skupině  $\geq 70\%$ .
- 2) Teplota vody by měla být v testovacích jamkách udržována při  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  během celého testu.
- 3) Celkové přežití embryí v negativní kontrole (ředicí vodě) a případně v kontrole rozpouštědla by mělo být  $\geq 90\%$  až do konce expozice (96 hodin).
- 4) Vystavení pozitivní kontrole (např. standard 3,4-dichloranilin  $c=4,0$  mg/l) by mělo mít za následek mortalitu minimálně 30% po ukončení expozice (96 hodin).
- 5) Míra líhnutí v negativní kontrole (nebo kontrole rozpouštědla) by měla být  $\geq 80\%$  po ukončení expozice (96 hodin).
- 6) Na konci expozice (96 hodin) by měla být koncentrace rozpuštěného kyslíku v negativní kontrole a v nejvyšší testované koncentraci  $\geq 80\%$  saturace.

## 2.1.3 Potřebné vybavení a zařízení pro provedení testu

- ✓ Nádrže pro chov ryb vyrobené z chemicky inertního materiálu (např. skla, plastu) a vhodné kapacity ve vztahu k doporučené obsádce ryb.
- ✓ Drátěná síť (velikost mřížky  $2 \pm 0,5$  mm) z nerezavějící oceli nebo jiného inertního materiálu k ochraně jiker po vytření ryb, případně substrát pro rozmnožování ryb (např. umělé rostliny z inertního materiálu).
- ✓ Pipety s rozšířenými otvory pro sběr jiker.
- ✓ Skleněné nádoby pro přípravu různých zkušebních koncentrací a ředící vody (kádinky, odměrné baňky, odměrné válce a pipety) nebo pro sběr jiker (např. kádinky, krystalizační misky).

- ✓ Inverzní nebo binokulární mikroskop s kapacitou alespoň 80násobného zvětšení. Není-li místnost temperována na  $26 \pm 1 \text{ }^\circ \text{C}$ , je nutná výbava teplotního zdroje pro udržení teploty jiker během pozorování.
- ✓ Testovací jamky, např. standardní 24 jamkové kultivační destičky o hloubce asi 20 mm, s možností přikrytí samolepicí fólií.
- ✓ Inkubátor nebo klimatizovaná komora s řízenou teplotou, umožňující udržovat teplotu  $26 \pm 1 \text{ }^\circ \text{C}$  v jamkách.
- ✓ Měřicí a záznamová technika - pH-metr, oxymetr (koncentrace kyslíku), vybavení pro stanovení tvrdosti a vodivosti vody.
- ✓ Pro provedení testu lze použít alternativní systémy expozice, jako je např. průtočný systém nebo pasivní dávkovací aparatura.

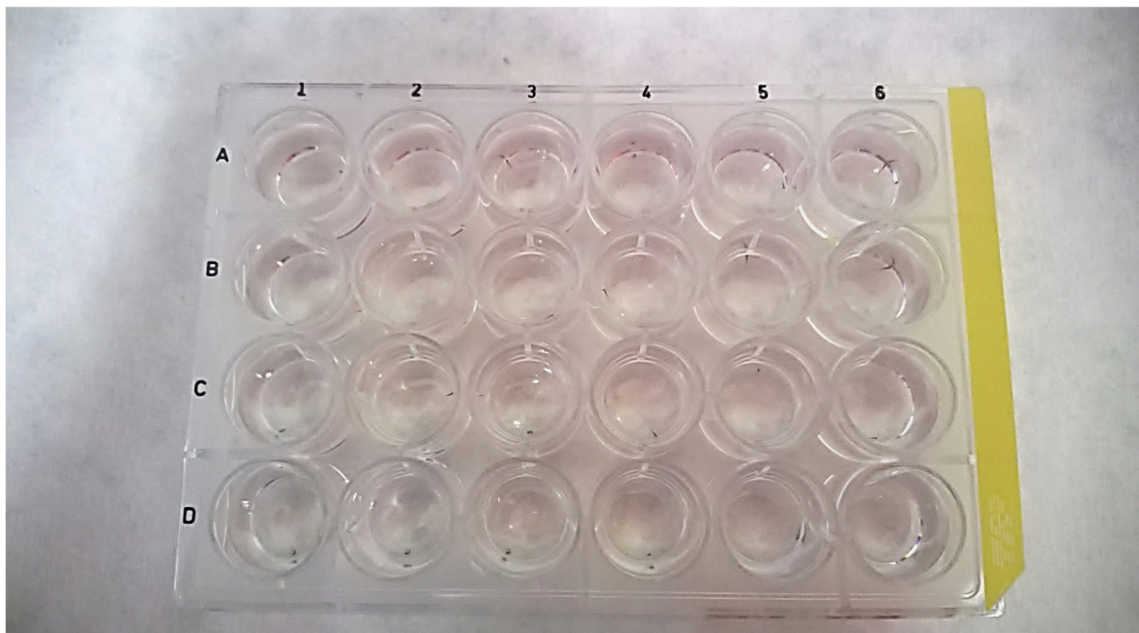
*Nádoba vhodná pro výtěr, vybavená nerezovou sítí a umělými*



*Chovné ryby - danio pruhované (Danio rerio) pro produkci jiker*



*Testovací jamky - standardní 24 jamková kultivační destička.*



## 2.1.4 VLASTNÍ PROVEDENÍ A POSTUP TESTU

Živé oplodněné jikry by měly být separovány od neoplozených a měly by být přeneseny do vytemperovaných 24-jamkových jamek. Prostřednictvím mikroskopu se vyberou oplodněné jikry, které se pravidelně dělí a nevykazují žádné zjevné nepravidlosti během dělení (např. asymetrie, tvorba vezikul) nebo poranění chorionu. Koncentraci testované chemikálie je vystaveno minimálně 20 embryí (jedno embryo na jamku). Po celou dobu celého testu by měla být udržována expozice  $\pm 20\%$  nominální chemické koncentrace. Testovací jamky by měly být před zahájením testu kondicionovány nejméně po dobu 24 hodin zkušebními roztoky. Test je zahájen co nejdříve po oplodnění jiker a ukončí se po 96 hodinách expozice. Embrya by měla být ponořena do zkušebních roztoků nejpozději ve fázi 16 buněk.

Pozorování provedená na každém testovaném embryu zahrnují ukazatele: koagulace jiker, absence tvorby somitů, neoddělení ocasu a absence srdečního tepu. Tato pozorování se používají pro stanovení letality: Jakýkoli pozitivní výsledek v jednom z těchto pozorování znamená, že embryo je mrtvé. Pozorování se zaznamenává každých 24 hodin, až do konce testu.

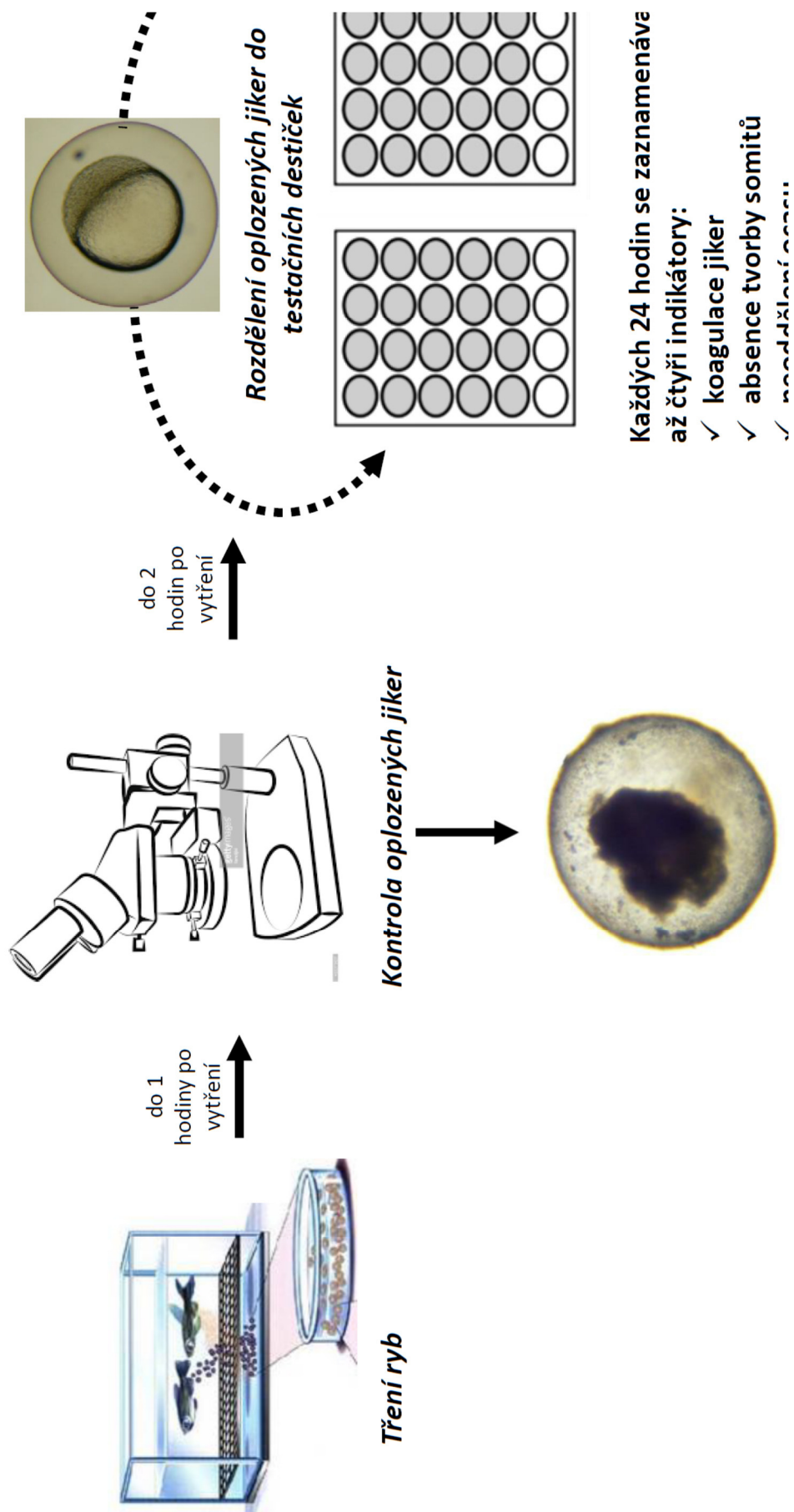
**Koagulace jiker:** koagulovaná embrya jsou mléčně bílé a pod mikroskopem vypadají tmavě. Počet koagulovaných embryí se stanoví po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

**Absence tvorby somitů:** Při  $26\pm 1^\circ\text{C}$  se po 24 hodinách vytvoří asi 20 somitů v normálně se rozvíjejícím embryu. Běžně vyvinuté embryo vykazuje spontánní pohyby (kontrakce). Spontánní pohyby naznačují vznik somitů. Absence somitů je zaznamenána po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Nevytvoření somitů po 24 hodinách může být způsobeno obecným zpomalením vývoje. Nejpozději po 48 hodinách by měla být vytvořena forma somitu. Pokud tomu tak není, jsou embrya považována za mrtvé.

**Neoddělení ocasu:** V normálně se vyvíjejícím embryu je pozorováno oddělení ocasu od žloutkového vaku. Absence oddělení ocasu je zaznamenána po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

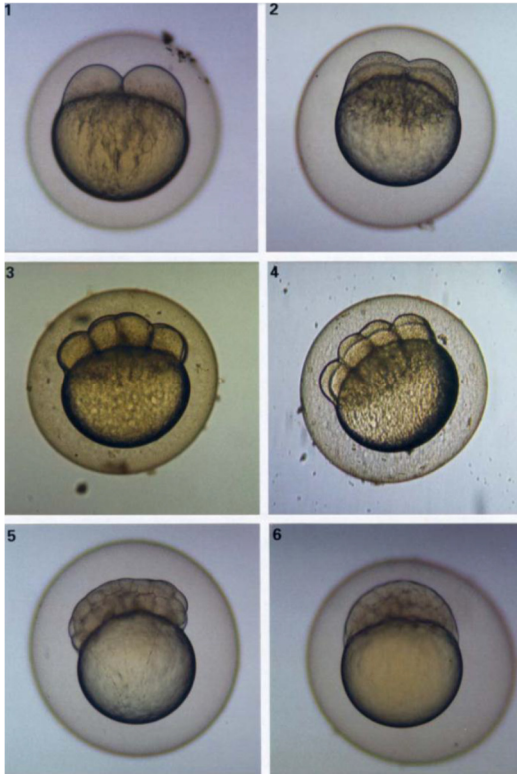
**Absence srdečního tepu:** V normálně se vyvíjejícím embryu při  $26\pm 1^\circ\text{C}$  je srdeční tep viditelný po 48 hodinách. Je třeba věnovat zvláštní pozornost záznamu tohoto parametru, protože nepravidelný srdeční rytmus by neměl být zaznamenán jako letální faktor. Navíc viditelný srdeční tep bez cirkulace v *aorta abdominale* není považována za letální. Pro záznam tohoto koncového bodu by embrya bez srdečního tepu měla být pozorována při minimálním zvětšení 80x po dobu nejméně jedné minuty. Absence srdečního tepu je zaznamenána po 48, 72 a 96 hodinách.

# Schéma embryonálního testu toxicity (OECD 236)

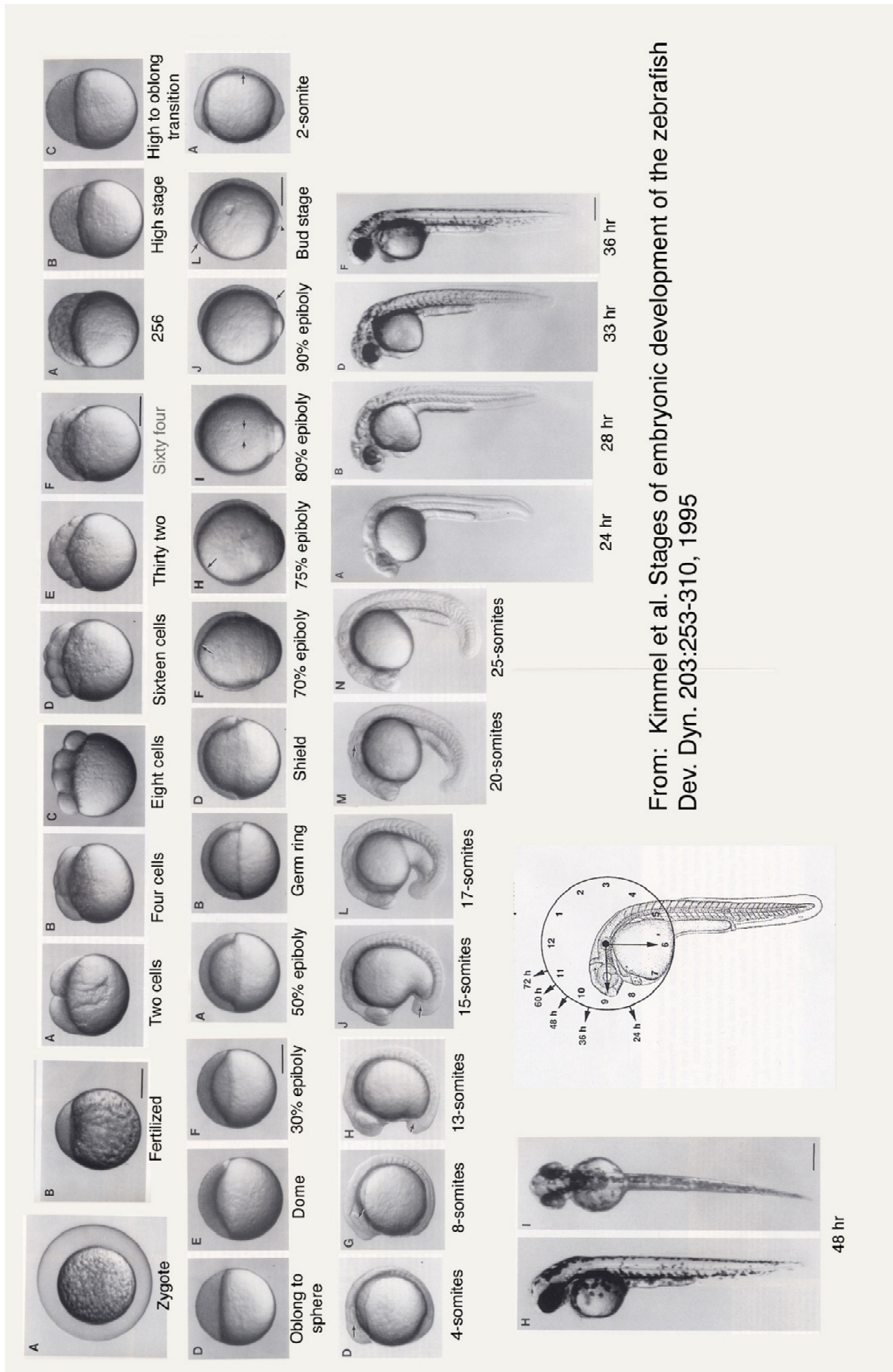


## Vývoj embrya dánia pruhovaného (*Danio rerio*) 0,75-5,3 hodin po oplození

(1) 0,75 hod. - dvou buněčné stadium; (2) 1 hod. - čtyř buněčné stadium; (3) 1,2 hod. - osmi buněčné stadium; (4) 1,5 hod. - šestnácti buněčné stadium (5) 4,7 hod., počínající epiboly; (6) 5,3 hod., 50 % epiboly (Braunbeck & Lammer 2006)



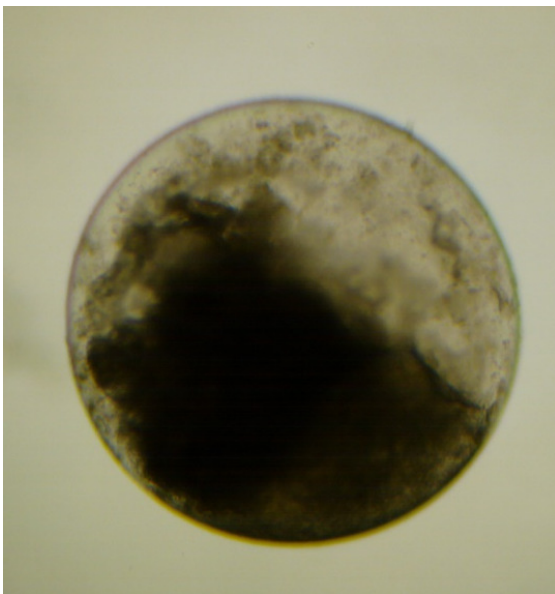
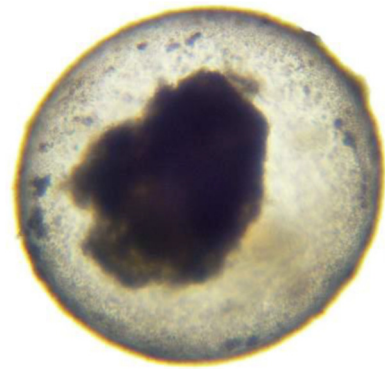
# Vývoj embrya dánia pruhoaného (*Danio rerio*)





Indikátorové abnormality ve vývoji oplozených jiker dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

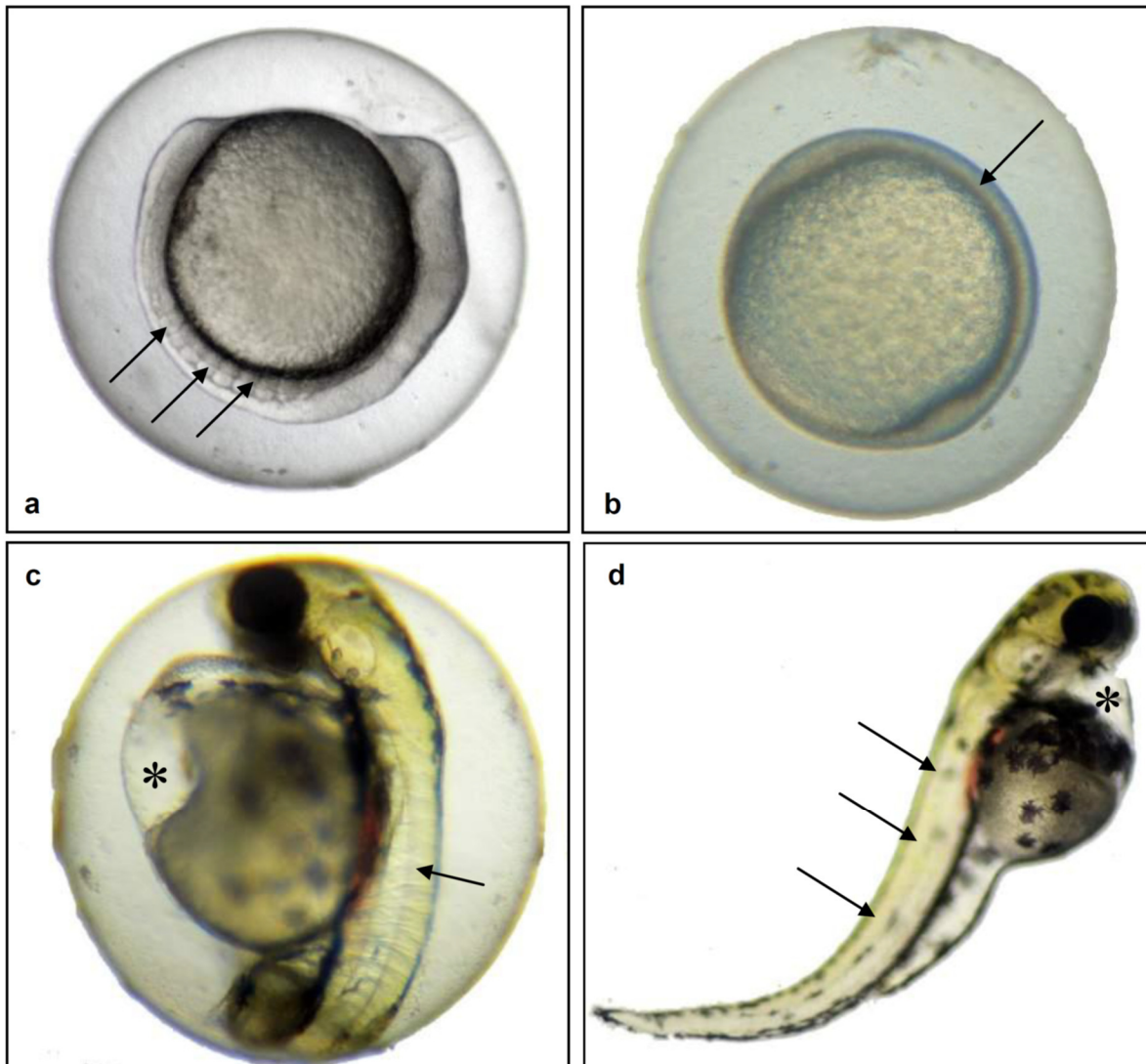
KOAGULACE JIKER



© OECD, (2013)

Indikátorové abnormality ve vývoji oplozených jiker dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

ABSENCE TVORBY SOMITŮ



(a) 24-hodin staré embryo: dobře vyvinuté somity (→)

(b) 24-hodin staré embryo: nevykazuje žádné známky tvorby somitů (→)

(c) 48-hodin staré embryo: zřetelná tvorba somitů (→), ale výrazný edém žloutkového vaku (\*)

(d) 96-hodin staré embryo: žádné známky tvorby somitů (→), zakřivení míchy (skolióza) a perikardiální edém (\*)

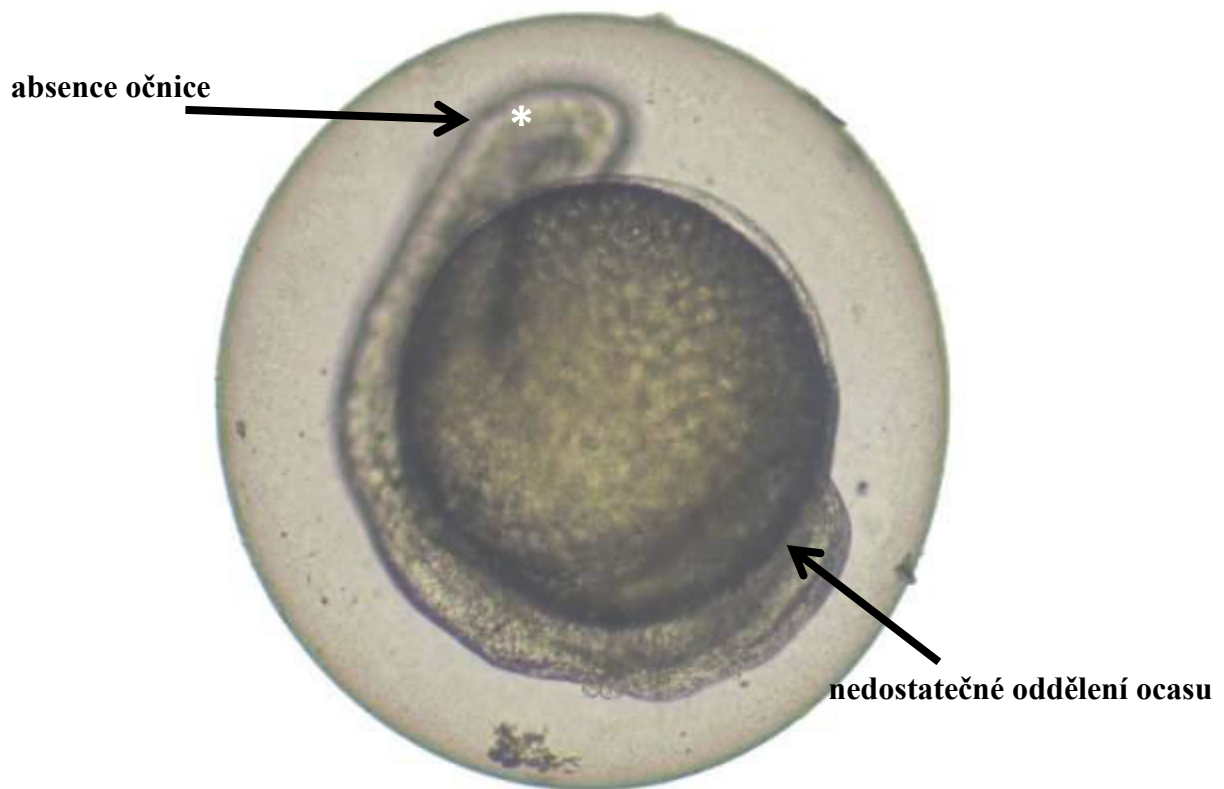
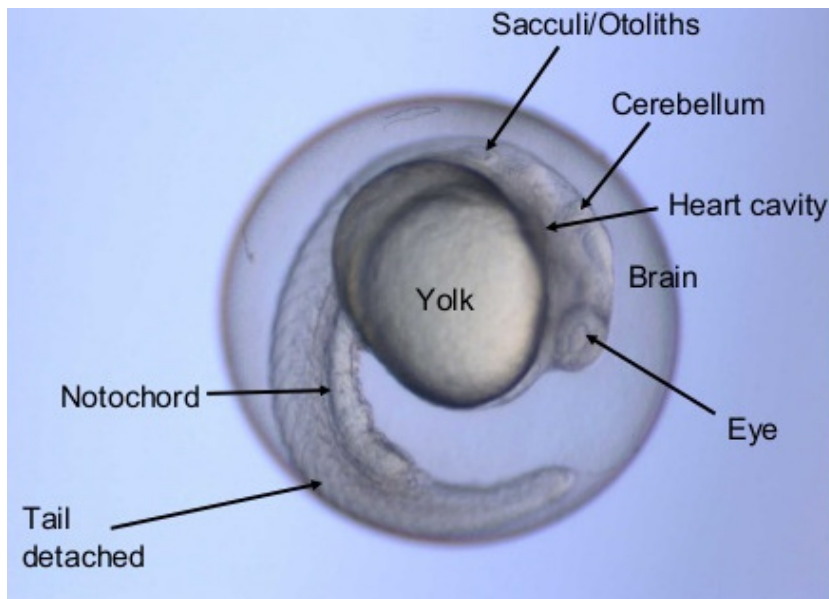
Indikátorové abnormality ve vývoji oplozených jiker dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

ABSENCE TVORBY SOMITŮ A DEFORMITY



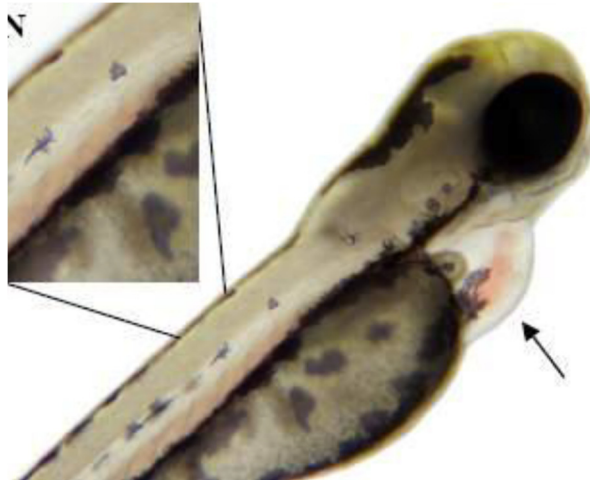
Indikátorové abnormality ve vývoji oplozených jiker dánia pruhoaného (*Danio rerio*)

NEODDĚLENÍ OCASU



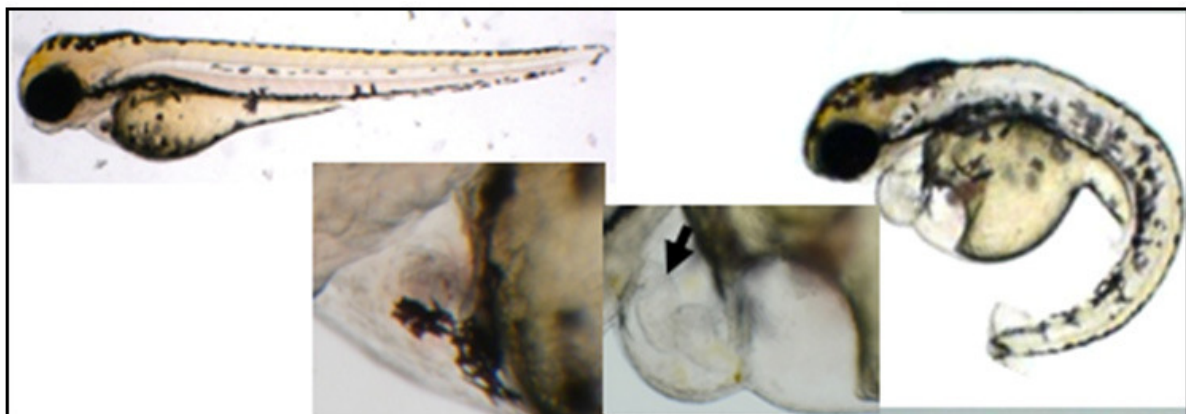
## Indikátorové abnormality ve vývoji oplozených jiker dánia pruho vaného (*Danio rerio*)

### ABSENCE SRDEČNÍHO TEPU

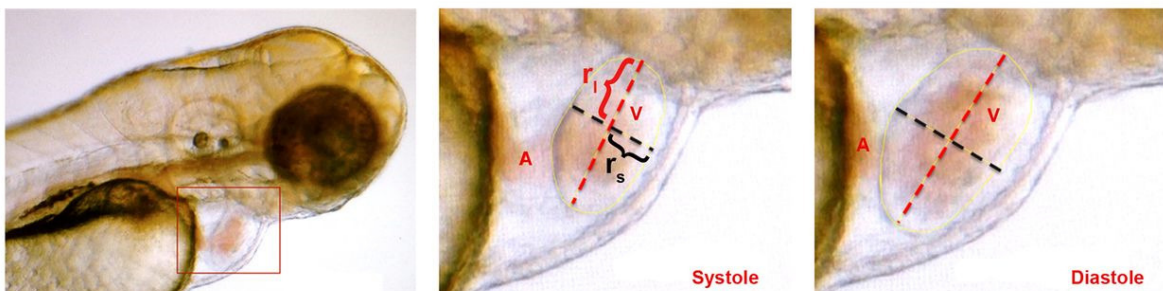


- obtížně pozorovatelný
- indikován nekonvulzí srdce (→)
- nepřítomnost srdečního tepu - nejméně jednu minutu s minimálním zvětšením 80 ×

### DEFORMITY SRDCE



A





## 2.2 POUŽITÍ ARTEMIÍ (ŽÁBRONOŽEK) V ALTERNATIVNÍCH TESTECH

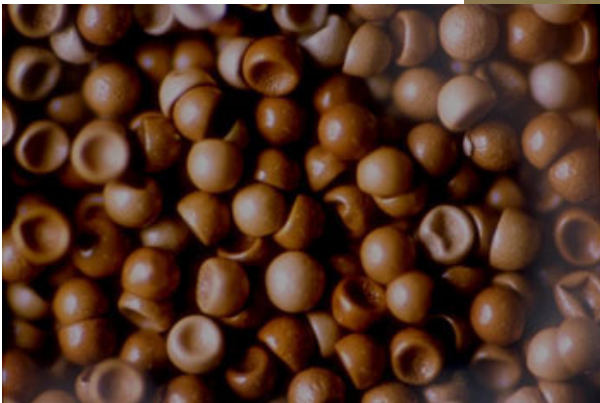
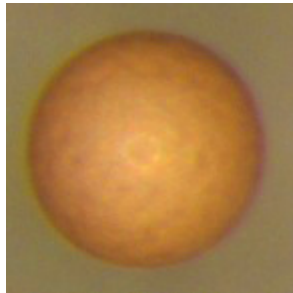
Hodnocení toxicity je vyžadováno při testování bezpečnosti chemických látek. Pro tento účel existuje sada standardizovaných normovaných testů. Tyto testy mají ale mnohé nevýhody (použití obratlovců, pracnost, vysoké náklady apod.) a jsou proto hledány testy nové. Citlivost žábřonožek je pro tyto účely dostatečná, nicméně ve srovnání s ostatními standardními organismy různá v závislosti na použitém toxikantu. Metoda se jeví z praktického hlediska výhodnou, protože umožňuje získat srovnatelné výsledky se standardními metodami s menšími nároky na manuální práci a s nižšími náklady

**Žábřonožka solná (*Artemia salina*)** je druh drobných slanovodních korýšů z čeledi žábřonožkovitých. Žábřonožka solná má podlouhlé tělo bez skořápky. Dospělci mají tři stopkaté složené oči a jedenáct párů lupenitých nožek, dorůstají délky až 15 mm. Žábřonožka solná je slanovodní organismus. Žije ve slaných jezerech. Je přizpůsobena životu ve vysychavých jezerech a snáší velké výkyvy salinity. V sladkých vodách po krátkém čase hyne – zhruba po hodině. Požívá zelené řasy. Žábřonožka solná se rozmnožuje pohlavně nebo partenogenezi. Vajíčka dokáží přečkat dlouhé období nepříznivých podmínek. Žábřonožka solná je v akvaristice využívána jako krmivo – zkrmována jsou všechna stádia: vajíčka, nauplie i dospělci.



## 2.2.1 LÍHNUTÍ VAJÍČEK/CYST

Obvykle se provádí tak, že se do laboratorní mořské vody, zpravidla o salinitě 1,2-3,0 ‰ NaCl odebere malé množství cyst. Vodu je dobré udržovat v mírném pohybu. Toho se nejlépe docílí provzdušňováním slabým proudem vzduchu. Tím se zajistí i adekvátní aerace. Je třeba nastavit proudění vzduchu tak, aby cysty vířily ve vodním sloupci a neležely na dně nebo na hladině. Líhivost kvalitních cyst se obvykle blíží 100 %. Optimální teplota pro líhnutí je 27-29 °C, kdy k vylíhnutí dochází přibližně do 18 hodin. Snížením teploty na 25 °C nedojde ke změně v citlivosti nauplií, ale k prodloužení doby líhnutí; při této teplotě se líhnou za 24 hodin a to je pro provozní podmínky v laboratořích často příznivější. Nevylíhlá vajíčka obvykle leží na dně, prázdné skořápky plavou na hladině. Živé žábřonožky jsou přitahovány světlem a lze je tedy pomocí bodového světelného zdroje dobře shromáždit na jednom místě a pak odlovit. Z jedné konzervy lze získat až několik milionů žábřonožek, u nichž je zaručena vysoká homogenita – stejné vlastnosti.





Pro testování se používají čerstvě vylíhnutí jedinci, tzv. nauplia. Bez krmení je životnost nauplií v ideálních podmínkách 96 až 120 hodin. Z Petriho misek jsou vylíhnutí jedinci přeneseni pipetou do misek s testovanými koncentracemi zkoumaného vzorku. Během testu se žábřonožky nekrmí. Testovaný roztok se neprovzdušňuje. Zaznamenává se úmrtnost nauplií. Nejčastěji se za dobu testu volí 24 hodin. Doporučuje se však odečítat úhyn i po delší době.

## 2.2.2 ZÁKLADNÍ TEST

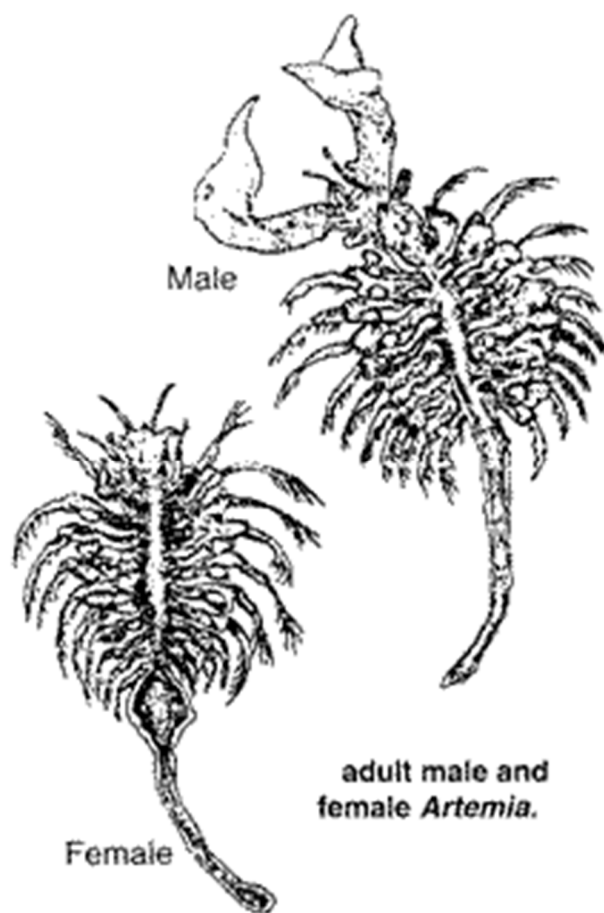
Touto zkouškou se stanoví procento uhynulých nauplií *Artemia salina* v různých koncentracích k určení hodnoty EC50. Cílem zkoušky by mělo být rovněž určení dalších hodnot (NOEC, LOEC, LC).

Připraví se testované koncentrace zkoumaného vzorku ředěné laboratorní mořskou vodou. Volí se obvyklým způsobem podle hodnot OC0 a OC100. Do Petriho misek o průměru 60 mm se odměří 10 ml zkoumaného roztoku. Podle uvážení se volí 2-3 paralelní nasazení. Do každé Petriho misky, se odloví 10 nauplií žábřonožek. Vzhledem k velké ploše hladiny a tudíž dostatečnému přestupu kyslíku lze misku zakrýt víčkem. Aerace se neprovádí. Teplota roztoků by se měla pohybovat v rozmezí 22-25°C. Zaznamenává se úmrtnost nauplií po 24, a po 48, 72, případně i po 96 a 120 hodinách. Jedná se tedy o závislost úmrtnosti žábřonožek v závislosti na koncentraci toxikantu a na čase. Po 120 hodinách již zpravidla všechny žábřonožky umírají na nedostatek potravy.

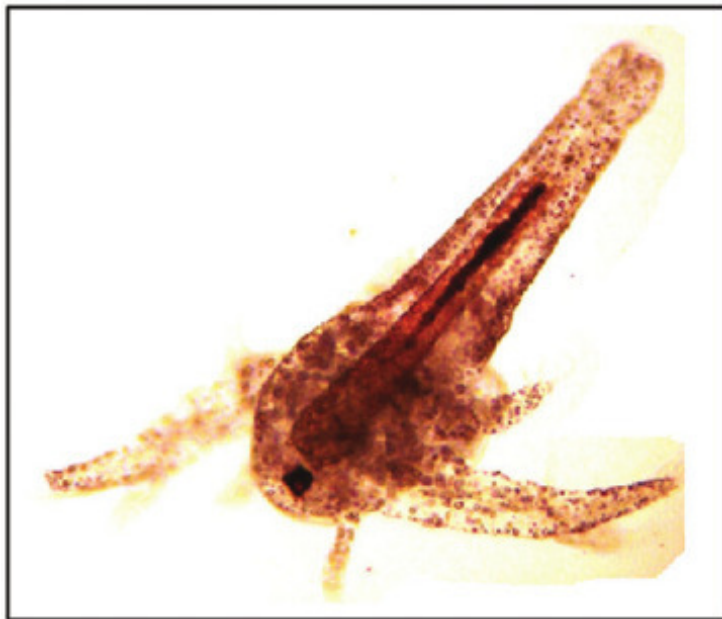
S testem se nasazuje minimálně jedna kontrola. Po stanovené době se spočítají uhynulé žábřonožky. Jestliže bylo použito k rozpuštění látky organické rozpouštědlo, připraví se ještě jedna kontrola s ředící vodou, obsahující nejvyšší koncentraci organického rozpouštědla, která byla použita v kterémkoliv zkoušeném roztoku.

### 2.2.3 PRACOVNÍ POSTUP

- Líhnutí vajíček (1. den)
  - Petriho miska se asi ze 2/3 naplní mořskou vodou ze zásobní láhve v laboratoři
  - přidá se přibližně čajová lžička zamrazených suchých vajíček žábřonožek
  - miska s vajíčky se na 24 hodin umístí do inkubátoru
- Nasazení organismu (2. den)
  - vodní výluh se naředí mořskou zředňovací vodou
  - 2 koncentrační řady, vč. 2 kontrol, se převedou do testovacích misek
  - pomocí mikropipety se nauplia zbaví prázdných cyst a přemístí se do testovacích misek po 10 jedincích
  - misky se na 48 hodin umístí v inkubátoru
- Odečtení a vyhodnocení (3. den)
  - vizuální odečtení mrtvých žábřonožek (leží na dně)
  - postup vyhodnocení viz obecná metodika







### 3 OBOHACENÍ CHOVU POKUSNÝCH ZVÍŘAT

Obohacení je princip chovu, který se snaží zvýšit kvalitu péče o zvířata v zajetí identifikací a poskytováním podnětů nezbytných pro optimální psychologickou a fyziologickou pohodu

Cíle obohacení:

- ✓ zlepšení kvality prostředí
- ✓ umožnění kontroly nad prostředím
- ✓ zvýšení počtu a rozsahu obvyklých vzorců chování zvířete;
- ✓ zvýšení behaviorální rozmanitosti
- ✓ zabránění rozvoji abnormálního chování nebo snížení četnosti či závažnosti těchto abnormalit
- ✓ zvyšování pozitivního využití prostředí
- ✓ umožnění schopnosti zvířete vyrovnat se změnám během pokusů, manipulací nebo změnám životního prostředí

Obohacení ovlivňuje mnoho zřetelů repertoáru chování a biologie jedince, ty se nejčastěji dají rozdělit do pěti obecných, avšak vzájemně se překrývajících kategorií (Bloomsmithe et al., 1991; Coleman et al., 2012):

- 1) **Sociální obohacení** – zahrnuje přímý nebo nepřímý kontakt s ostatními jedinci stejného druhu nebo s lidmi. Tento kontakt může být vizuální, čichový, sluchový či taktilní.
- 2) **Obohacení pracovní náplně** - zahrnuje jak psychologické obohacení (například zařízení, která poskytují zvířatům možnost kontroly nad prostředím) a obohacení, které podněcuje cvičení a fyzickou aktivitu.
- 3) **Fyzické obohacení prostředí** – může zahrnovat změnu velikosti, uspořádání či členitosti životního prostředí zvířete, anebo přidání dalšího příslušenství do prostoru (substráty, trvalé konstrukce), které může zvíře využít.
- 4) **Smyslové obohacení** – zvířeti jsou dopřány podněty vizuální (televize), sluchové (hudba, vokalizace) nebo v dalších formách (čichové, taktilní, chuťové).
- 5) **Nutriční obohacení** – zvířeti jsou podávány rozmanité či nové typy či druhy krmiva, eventuálně je změněn způsob podávání krmiva.

Otázky kompatibility a praktičnosti obohacení:

- 1) Je potrava, substrát nebo hračka kompatibilní s cílem dané studie či použití? Je možné definovat chemicky jeho složení a případná rizika?

- 2) Jsou obohacující prvky slučitelné s režimem daného zařízení? Neznamenají neúnosné zatížení personálu či časově náročných kroků, jako například dezinfekce zařízení?
- 3) Jaké jsou ekonomické náklady na pořízení a provoz jednotlivých prvků obohacení?

### 3.1 DOPLŇKOVÉ STUDIJNÍ MATERIÁLY PRO OBOHACENÍ VYBRANÝCH SKUPIN POKUSNÝCH ZVÍŘAT

#### 3.1.1 OBOHACENÍ U POKUSNÝCH ZVÍŘAT Z POHLEDU WELFARE POKUSNÝCH HLODAVCŮ, KRÁLÍKŮ, FRETEK A SUBHUMÁNNÍCH PRIMÁTŮ

#### **ENRICHMENT IN EXPERIMENTAL ANIMALS IN TERMS OF WELFARE OF EXPERIMENTAL RODENTS, RABBITS, FERRETS, AND NON-HUMAN PRIMATES**

**Martin Hostovský\*<sup>1</sup>, Lucie Plhalová<sup>1</sup>, Jana Jozefová<sup>2</sup>, Vladimír Večerek<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie; <sup>2</sup>Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství; Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

<sup>1</sup>Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour; <sup>2</sup>Department of Veterinary Public Health and Forensic Medicine; University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

#### *Summary*

*Complete fulfilment of the importance of animal welfare requires not only the realization of the requirements of good biological function, but also to achieve a positive psychological state of the individual. One way to achieve this is the enrichment. While in rodents the enrichment through suitable materials for nest building plays generally an important role, guinea pigs appreciate structuring in environment or different elevated platforms. Ferrets and non-human primates prefer to use enrichment by playing, training and placed items. In all groups of experimental animals a short alternating enriching components and their suitable combination have been reported useful. Evaluation of enrichment is becoming not only a legislative requirement but also a prerequisite for the fulfilment of all modern demands for the welfare of animals. Individual groups of species have different demands for enrichment, by complying of them, we can get a new perspective on the effects of changes to which the animals are exposed during scientific studies. The aim of this work is to review the possibility of enrichment for selected groups of animals.*

*Key words: experimental animal, well-being, animal husbandry, environmental enrichment*

#### *Souhrn*

*Úplné naplnění významu welfare zvířat nevyžaduje pouze splnění požadavků na dobrou biologickou funkci, ale také dosažení pozitivního psychického stavu jedince. Jedním ze způsobů, jak toho dosáhnout je obohacení. Zatímco obecně u hlodavců hraje důležitou roli obohacení prostřednictvím vhodných materiálů pro stavbu hnízda, pokusní králíci uvítají členitost prostředí nebo různé vyvýšené platformy. Fretky a subhumánní primáti dávají přednost využití obohacení hrou, tréninkem a umístěnými předměty. U všech skupin pokusných zvířat se osvědčilo krátkodobé střídání obohacujících prvků a jejich vhodná kombinace. Hodnocení obohacení se stává nejenom legislativním požadavkem, ale také je předpokladem k naplnění všech moderních nároků na welfare pokusných zvířat. Jednotlivé skupiny druhů zvířat mají různé nároky na obohacení, jejich vyhověním získáme nový pohled na účinky změn, kterým jsou zvířata během vědeckých studií vystavována. Cílem této práce je podat přehled možností obohacení u vybraných skupin pokusných zvířat.*

*Klíčová slova: pokusné zvíře, pohoda, chov zvířat, obohacení prostředí*

\*hostovskym@vfu.cz

## **Úvod**

Při používání pokusných zvířat vzniká mnoho otázek ohledně naplnění či uspokojení potřeb jejich welfare. Welfare zvířete je kvalitou jeho života na základě posouzení fyzického a psychického stavu zvířete, což je v podstatě údaj o tom, jak zvíře zvládá současnou situaci a jak se zvíře cítí. Dobré životní podmínky jsou pak současným stavem zvířete, pokud jde o jeho vztah se všemi aspekty svého prostředí, a to jak vnitřními i vnějšími. To předpokládá pozitivní psychický stav, zdárnou biologickou funkci, pozitivní zkušenosti a svobodu před nepříznivými podmínkami (Webster, 1994; Appleby and Hughes, 1997). Vezmeme-li v úvahu všechny složitější aspekty podílející se na koncepci životních podmínek, lze konstatovat, že pohoda zvířete je tedy určena jeho schopností zabránit utrpení a současně udržet kondici. To znamená, že blaho organismů závisí na mnoha faktorech spojených s životním prostředím, ve kterém žijí a současně v něm mají biologickou roli a postavení (Webster, 1994). Zařízení pro pokusná zvířata bývají obvykle navržena tak, aby splňovala standardní kritéria pro jejich ustájení, ve kterém jsou splněny nároky na jejich fyzické zdraví a současně musí splňovat ekonomickou nákladnost a ergonomickou praktičnost. Vzhledem k možným projevům poruch chování spojených s psychickou kondicí, vznikla celá řada postupů jak zlepšit prostředí chovaných zvířat, která jsou obecně označena pojmem „obohacování životního prostředí“ (Olsson and Dahlborn, 2002). Velice dlouhou dobu bylo obohacení welfare pokusných zvířat považováno



za negativní faktor pro výzkum, zejména z pohledu ekonomických či z obavy před ovlivněním výsledků daných studií. Druhově vhodná úprava životního prostředí se však ukázala jako velmi důležitá pro dobré životní podmínky zvířat použitých ve výzkumu, ale také měla zásadní vliv na nové výstupy výzkumných prací. Nyní se obohacení prostředí pokusných zvířat stává jedním z prvků rutinního chovu a současné poznatky o způsobech obohacování se stále více prohlubují (Bloomsmithe et al., 1991; Webster, 1994; Coleman et al., 2012).

Účelem této práce je podat přehled možností obohacení u vybraných skupin pokusných zvířat popsaných v literatuře a uvést praktické příklady použitelných postupů obohacení v kontextu s vědeckovýzkumným či vzdělávacím způsobem použití pokusných zvířat.

### **Obecná hlediska obohacení welfare pokusných zvířat**

Obohacení bývá obvykle definováno jako princip chovu, který se snaží zvýšit kvalitu péče o zvířata v zajištění identifikací a poskytováním podnětů nezbytných pro optimální psychologickou a fyziologickou pohodu (Shepherdson, 1998; Bloomsmithe et al., 1991; Webster, 2006; Coleman et al., 2012). Samotný termín „obohacení“ nemá bohužel zcela přesnou a jedinou definici a je často používán pouze v souvislosti se změnami prostředí, které zahrnují přidání jednoho nebo více objektů či podnětů do životního prostoru zvířete. Nezohledňuje však zpravidla celkovou koncepci obohacení, ve smyslu zavedení nových prvků za účelem konkrétních koncových bodů těchto změn, jako například zlepšení biologického fungování zvířete (Newberry, 1995; Young, 2003). Proto by stanovené cíle programů obohacování měly zahrnovat zejména: zvýšení počtu a rozsahu obvyklých vzorců chování zvířete; zabránění rozvoji abnormálního chování nebo snížení četnosti či závažnosti těchto abnormalit; zvyšování pozitivního využití prostředí; umožnění schopnosti zvířete vyrovnat se změnám během pokusů, manipulací nebo změnám životního prostředí (Young, 2003; Coleman et al., 2012).

Obohacení ovlivňuje mnoho zřetelů repertoáru chování a biologie jedince, ty se nejčastěji dají rozdělit do pěti obecných, avšak vzájemně se překrývajících kategorií (Bloomsmithe et al., 1991; Coleman et al., 2012):

- 1) Sociální obohacení – zahrnuje přímý nebo nepřímý kontakt s ostatními jedinci stejného druhu nebo s lidmi. Tento kontakt může být vizuální, čichový, sluchový či taktilní.
- 2) Obohacení pracovní náplně - zahrnuje jak psychologické obohacení (například zařízení, která poskytují zvířatům možnost kontroly nad prostředím) a obohacení, které podněcuje cvičení a fyzickou aktivitu.

- 3) Fyzické obohacení prostředí – může zahrnovat změnu velikosti, uspořádání či členitosti životního prostředí zvířete, anebo přidání dalšího příslušenství do prostoru (substráty, trvalé konstrukce), které může zvíře využít.
- 4) Smyslové obohacení – zvířeti jsou dopřány podněty vizuální (televize), sluchové (hudba, vokalizace) nebo v dalších formách (čichové, taktilní, chuťové).
- 5) Nutriční obohacení – zvířeti jsou podávány rozmanité či nové typy či druhy krmiva, eventuálně je změněn způsob podávání krmiva.

Velice diskutovaným je téma rovnováhy mezi naplněním fyzické či psychické potřeby pokusného zvířete a optimálním získáním stanovených cílů vlastního výzkumu či výuky. Pro uživatele pokusných zvířat je však rovněž velmi důležité vyhodnocení náročnosti nákladů a vhodnosti použití metody obohacení, s možnými dopady na získané výsledky. Celé instituce či jednotliví vědci pak obvykle zvažují následující otázky (Bloomsmit et al., 1991; Young, 2003; Coleman et al., 2012):

- 1) Je jídlo, substrát nebo hračka kompatibilní s cílem dané studie či použití? Je možné definovat chemicky jeho složení a případná rizika?
- 2) Jsou obohacující prvky kompatibilní s režimem daného zařízení? Neznamenají neúnosné zatížení personálu či časově náročných kroků, jako například dezinfekce zařízení?
- 3) Jaké jsou ekonomické náklady na pořízení a provoz jednotlivých prvků obohacení?

Z vědeckého hlediska tedy vyplývá obava, že obohacování negativně ovlivňuje jak experimentální platnost, tak reprodukovatelnost výsledků. Většina dnešních zjištění ale potvrzují, že zajištěním vhodného obohacování se zvyšuje pohoda pokusných zvířat, a tím se specifikují odpovědi zvířecího modelu na následnou změnu. Pokusná zvířata tak často nově mohou vyjádřit druhově typické chování. Obohacením welfare zvířat tak vlastně dochází ke zkvalitnění a zpřesnění procesu tvorby výzkumných dat a poznatků (Bayne and Würbel, 2014).

### **Hodnocení obohacení welfare pokusných zvířat a legislativní požadavky**

Úroveň a kvalita obohacení chovu pokusných zvířat by měla být empiricky hodnocena v pravidelných intervalech, aby bylo docíleno optimálních biologických i legislativních požadavků. Pokud budeme posuzovat obohacení, můžeme se přímo soustředit na chování subjektů, zda je typicky druhové nebo se projevují prvky tzv. abnormálního chování. Abnormální chování je takové, které se obvykle nevyskytuje u divokých zvířat stejného druhu

anebo se jeho projevy vyskytují u zvířete na abnormální úrovni ve srovnání se zástupci stejného druhu ve volné přírodě (Poole, 1988). Nepřímo pak můžeme hodnotit přítomnost či nepřítomnost vhodných obohacujících prvků, velikosti či uspořádání prostředí pro chovaná pokusná zvířata, nebo prvků obohacení zakomponovaných již v provozních řádech a pracovních postupech jednotlivých zařízení (Bayne, 2003; Doporučení 2007/526/ES; Coleman et al., 2012). Důležitou roli v hodnocení a kontrole obohacení jsou legislativní podklady, které mohou aplikovat kontrolní a dohlížející orgány ochrany pokusných zvířat.

Jedná se zejména o zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, jehož prováděcím předpisem vztahujícím se k pokusným zvířatům je vyhláška č. 419/2012 Sb. (dále jen vyhláška), o ochraně pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů. Podle odst. 4 §17a zákona je chovatel pokusných zvířat, dodavatel pokusných zvířat a uživatel pokusných zvířat povinen dodržovat nejen požadavky na prostor, ale také specifické podmínky týkající se péče a umístění ve vztahu k jednotlivým druhům pokusných zvířat stanovených Vyhláškou (§ 6 vyhlášky). Tato vyhláška upravuje také potřeby sociálního obohacení pokusného zvířete, neboť společenská zvířata musí být správně umístěna ve stabilních skupinách, dočasně odloučená zvířata se musí opět vrátit do skupiny a vše musí být pečlivě monitorováno a kontrolováno chovateli. Při individuálním umístění musí být s pokusným zvířetem udržován zrakový, sluchový, čichový nebo dotykový kontakt, viz písm. c) Příloha 8 vyhlášky. Doporučujícím pravidlem je i podpora rozmanitosti prostředí, které podporuje přizpůsobení pokusných zvířat podle druhu, umožňující tělesný pohyb, získávání potravy, hraní a kognitivní činnosti, viz písm. d) Příloha 8 vyhlášky.

Požadavek na obohacení pro pokusná zvířata se rovněž promítnul do procesu schvalování projektu pokusů. Podle formuláře žádosti o schválení projektu pokusů § 5 vyhlášky, viz Příloha č. 4 k této Vyhlášce, je v bodě č. 17: „*Podmínky umístění a chovu pokusných zvířat a péče o ně včetně obohacení prostředí*“ nutné popsat nejen způsob zajištění vhodných podmínek umístění a péče o pokusná zvířata, ale také jak bude uplatňováno obohacení (sociální obohacení a obohacení prostředí). Téma obohacení chovu pokusných zvířat se tak dostává rovněž do komplexního procesu hodnocení žádosti o schválení projektu pokusů, které začíná již na úrovni uživatelského zařízení, kdy je žádost předkládána nejprve tzv. Odborné komisi pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat (dále jen Odborná komise). Úkolem Odborné komise je mimo jiné sledování a kontrola účinku pokusů na používaná pokusná zvířata, přičemž by měla poskytovat poradenství i v možnostech obohacení (podle § 15g zákona). Doporučení Komise ES (2007/526/ES), týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně, uvádí obecná doporučení na ustájení a obohacení prostředí, která

jsou v dalších oddílech konkretizována pro jednotlivé druhy pokusných zvířat. Tento akt byl transponován do legislativní úpravy ČR v podobě výše zmíněné vyhlášky, avšak z pohledu našeho tématu obohacení, je obsáhlejší a více specifickéjší, zejména v oddílu pro jednotlivé zvířecí druhy.

## **Možnosti obohacení u jednotlivých druhů pokusných zvířat:**

### **Obohacení welfare pokusných hlodavců**

Pro hlodavce je kladen důraz na počet umístěných jedinců v boxu tak, aby zvířata měla možnost projevit sociální chování, ale zároveň se musí včas zabránit soupeření a agresí mezi jedinci. Velmi důležité jsou pak použité materiály pro podestýlku a pro stavění hnízda (Doporučení 2007/526/ES). Podle současných poznatků znamená poskytnutí vhodné podestýlky výrazné zlepšení životních podmínek hlodavců, neboť je umožněn projev přirozených a důležitých vzorců chování. Zároveň se chovaným zvířatům tímto poskytuje útočiště a získají tak částečnou kontrolu nad svým prostředím (Olsson and Dahlborn, 2002; Baumans, 2005). Pro morčata jsou pak vhodnějšími úkryty, různé budky či přístřešky uvnitř klece. Pískomilové potřebují obvykle větší prostory a současně hlubší vrstvu podestýlky pro budování hnízd či nory, která musí být alespoň 20 cm dlouhá, nebo poskytnutí náhradního obohacujícího prvku, jakým jsou trubky či domky z plastu (Baumans, 2005; Doporučení 2007/526/ES). Čištění a výměna podestýlky jsou nezbytným rutinním postupem při chovu laboratorních hlodavců. Vhodné časování výměny použitého materiálu pak může být pro hlodavce taktéž obohacujícím prvkem, neboť například laboratorní myši tráví 10 až 20% času manipulací s hnízdím materiálem a stavěním vlastního hnízda (Van de Weerd et al., 1997). Nicméně úplné odstranění čichových podnětů může narušit sociální hierarchii zvířat v kleci, což má často za následek agrese mezi samci. Umístění malé části použité hnízdní podestýlky pak snižuje agresivitu, naopak ponechání podestýlky obsahující moč či výkaly u myši agresí zvýšilo (Van Loo et al., 2000).

Dalšími obohacujícími prvky jsou různé hračky z vhodných materiálů, které mohou mít blahodárný účinek na zvířata ve vývoji průzkumného chování, pohybového či vizuálního výkonu. Použitými materiály jsou buď odolná nerezová ocel, nebo okusovatelné inertní plasty, které napomáhají fyziologickému opotřebování hlodávků. Hračky mají však často omezený čas přitažlivosti pro zvíře, typicky je zhruba jeden den, ovšem frekventovanou výměnou za jiné obohacující prvky lze tuto atraktivitu prodloužit (Young, 2003; Baumans, 2005). Diskutabilní je náhled na otázku zvukové stimulace, neboť u některých hlodavců měl konstantní hluk pozadí

během dne (např., 85 dB) pozitivní vliv na snížení lekavosti a dráždivosti myši (NRC, 1996). Tak například rozumné používání radiostanic ošetřovateli v zařízeních pro pokusná zvířata během dne může mít příznivé důsledky na lekavost pokusných zvířat (Baumans, 2005). Sensorické stimuly jsou proto čistě individuální, i z hlediska druhů zvířat, neboť se v dalších odkazech popisuje, že myši během vystavení hluku vykazovaly spíše rušivé reakce, a to bez ohledu na hudbu v pozadí (Van Loo et al., 2004). Z dalších možností obohacení o sensorické podněty se například použití zrcátek umístěných do klecí myším neosvědčilo, neboť nejčastěji používané albinotické formy laboratorních myši mají pravděpodobně sníženou schopnost vidění (Sherwin, 2004). Co se týká obohacení pro hlodavce prostřednictvím potravy, je situace zcela závislá na potřebách dané laboratoře či konkrétního pokusu. Přednost se dává kompletním krmným směsím pro daný druh hlodavců, přizpůsobených velikostí i nutričním nárokům pokusných zvířat. Granule či pelety jsou podávány do krmítek tak, aby je zvířata musela okusovat, což je rovněž formou obohacení, neboť se tak uspokojují vzorce chování spojené s hledáním či získáváním potravy (Blom et al., 1995, Brain, 1999). Obecně platí, že hlodavci by měli mít stále přístup k materiálům vhodným ke hlodání, žvýkání či okusu. Může jim být předkládáno seno, sláma, nebo travní kostky, které uspokojují potřebu balastních látek, nebo hračky, jako již zmíněný obohacující prvek, z měkkého dřeva či inertních plastů (Baumans, 2005). Problémem u křečků či pískomilů může být pak uchovávání potravin v hnízdech či vytváření zásobáren uvnitř klecí (Brain 1999).

### **Obohacení welfare pokusných králíků**

Obohacení je u pokusných králíků zcela závislé na prostorových možnostech ustájení, které obvykle neposkytují zvířatům příležitost vyjádřit více z typických vzorců druhového chování. Možností jsou však různé druhy přepážek, úkrytů a konstrukcí u skupinového ustájení, nebo různé vyvýšené platformy a hnízdní budky pro ustájení individuální. Boxy a materiál pro stavbu hnízda by měl být samozřejmou výbavou klecí pro gravidní samice. Stejně jako u hlodavců, materiál pro ohryz či na žvýkání je u všech pokusných králíků nutností (Bayne 2003; Baumans 2005).

Králíci jsou obvykle krmeni kompletními směsmi, kdy možnosti obohacení prostřednictvím potravy jsou minimální. Avšak frekvence a plán krmení mají vliv na obohacení, neboť králíci krmení bezprostředně před setměním, v jejich přirozeně aktivním období, snižuje výrazně stereotypní chování (Krohn et al., 1999). Další možností je pak rozptýlení sena či potravin do podestýlky, což podporuje jejich přirozené chování při hledání potravy. Problémem je ale poté kontaminace této potravy výkaly či močí (Baumans, 2005). Zájem králíků pak vzbudí různé

další obohacující předměty a objekty, které jsou zavěšeny nebo volně umístěny klecích a králíci je mohou okusovat či volně s nimi pohybovat. Všechny tyto předměty povzbuzují zvířata k přirozeným prvkům chování, musejí však být z inertních materiálů, které vyloučí ovlivnění případného pokusu (Bayne, 2003).

### **Obohacení welfare pokusných fretek**

V otázce obohacení prostředí u fretek hraje důležitou roli uspořádání prostoru, které by mělo splňovat fyziologické i etologické požadavky těchto společenských a zvědavých zvířat. Fretky jsou přirozeně společenské a mohou být chovány v kompatibilních párech nebo skupinách bez agrese, a to zejména v případě, že je jejich prostředí dostatečně obohaceno (Ball, 2006). Fretky vyžadují rozmanité a členité prostředí s různými zavěšenými předměty a lůžky, umělými norami, tunely s cílem podpořit jejich zájem a aktivitu. Ačkoliv fretky stráví až 75% svého času (často 20 hodin denně) spánkem, nejlépe v tmavých prostorech, zbytek času si intenzivně hrají a prozkoumávají prostředí. Fretky jsou nejvíce aktivní za soumraku. Fretky potřebují zejména prvky obohacení, na které mohou vyšplhat nebo které mohou uchopit. Dalším důležitým faktorem je cvičení a udržování tělesné kondice fretek, přičemž velmi dobrým způsobem obohacení může být hraní ve vodní lázni alespoň jednou týdně (Einon, 1996; Ball, 2006).

### **Obohacení welfare pokusných subhumánních primátů**

Péče o subhumánní primáty v biomedicínských zařízeních prošla během posledních dvou desetiletí dramatickou transformací, a ačkoliv obecně chov primátů v laboratoři vyvolává řadu problémů a etických otázek, výsledkem je dramatické zlepšení podmínek chovu, psychické pohody a dobrých životních podmínek této důležité skupiny pokusných zvířat. Podmínky a nároky na chovné či uživatelské zařízení jsou zcela závislé na konkrétním druhu subhumánních primátů, obecně však platí vysoké nároky na prostor, uspořádání a kvalitu použitých materiálů. V neposlední řadě musí být naplněna fyzická a psychická potřeba obohacení prostředí, neboť pokud nejsou splněny, může následek nepříznivě ovlivnit chování a fyzické zdraví zvířat (Doporučení 2007/526/ES; Coleman et al., 2012).

Velice důležitým je pak systém chovu, neboť většina primátů žije přirozeně v komplexních koloniích, obohacení prostřednictvím sociálních interakcí je proto zásadní. Individuálně chovaní primáti mají obvykle méně místa v klecích, méně sociálních interakcí a je větší pravděpodobnost vzniku stresových vzorců chování než u primátů chovaných ve skupinách (Bayne et al., 1991). Problémem skupinového chovu je naopak riziko vzájemné interakce vyúsťující v agresi či napadení jedinců, neboť hierarchické uspořádání bývá složité a velmi

křehké. Chov primátů v párech či skupinách umožňuje kontakt, vzájemnou péči o srst a předchází dlouhodobému strádání z izolace (Bayne 2003; Coleman et al., 2012).

Zajímavé je zjištění, že subhumánní primáti nedávají přednost obohacení sociálních či nutričních potřeb, ale spíše využívají obohacení zařízení (Bayne et al., 1994; Reinhardt, 1994). Zvířata pak velice často využívají různé hřady či vyvýšená patra, žebříky či různé předměty z plastů. Obohacením prostředí jsou také oddělené prostory či různé výklenky, umožňující jim vybrat si optimální pozici ve skupině či jednotlivě v chovatelském zařízení. Možností obohacení primátů v klecích je například pestrý režim a plán krmení, umístění různých hraček, dodatečná sensorická stimulace (hudba, zrcadla, pachové stopy, videoprojekce), nebo použití obohacení ze zničitelných inertních materiálů (např. papíry, krabičky). Další pozitivními stimuly jsou interakce s lidmi, které částečně kompenzují nedostatek sociálních vnitrodruhových interakcí. Komerční nabídka obohacujících předmětů (hraček) nejen pro subhumánní primáty je v současné době nezměrná, velikost a vlastnosti materiálů hračky by měly být ovšem velmi zváženy ve vztahu k vysoké inteligenci, fyzické síle a zručnosti primátů (Coleman et al., 2012). Rovněž je důležité, jako u jiných skupin zvířat, aby umístěné obohacující předměty vzbuzovaly zájem, neboť je potvrzeno, že právě například zájem o umístěná zrcadla v zařízení pro subhumánní primáty je spíše krátkodobý a stejně jako u dalších předmětů a hraček, tento zájem stoupá po krátkodobé výměně či absenci těchto důležitých obohacujících předmětů (O'Neill-Wagner et al., 1997; Bayne, 2003).

Samostatnou kapitolu by mohlo tvořit nutriční obohacení a samozřejmě i obohacení, prostřednictvím rozvinutých činností a tréninku s pokusnými primáty, které tak často nahrazují sociální kontakt s jedinci vlastního druhu. Bylo vypracováno nespočet studií a moderní chovy laboratorních subhumánních primátů již by bez těchto prvků obohacení snad v současné době neměly z etických ani právních požadavků existovat (Dean, 1999; Bayne, 2003; Coleman et al., 2012).

## **Závěr**

Obohacení prostředí zahrnuje zkvalitnění fyzického nebo sociálního prostředí zvířete a je stále více vnímáno jako významná součást úsilí o zlepšení podmínek pro zvířata používaných ve výzkumu a výuce. Je třeba zvážít, v jakých případech lze poskytnout jedincům příležitost pro sociální interakce, větší pohyb, možnost využití hraček, vlastní volbu a rozhodnutí, či zavedení složitých zařízení pro uplatnění všech zásad obohacení. Často však postačí základní prvky obohacení, které nejsou ekonomicky ani časově náročné, avšak pro zvíře znamenají zkvalitnění jeho života. Jedním z předpokladů dodržování dobrých životních podmínek pokusných zvířat

se tak stává i obohacení jejich welfare. Jako základ pro kontrolu a vyhodnocení tohoto požadavku je stanovena příslušná legislativa, která bude přiblížena níže, avšak poznatky o možnostech obohacení se stále vyvíjejí, tak jako se prohlubují znalosti etologie a biologie jednotlivých druhů pokusných zvířat, a proto všechny zainteresované skupiny v oblasti používání pokusných zvířat musí reflektovat nejen stávající právní požadavky, ale také skutečnou potřebu všech zvířecích druhů v pokusech, které představují mnohdy nenahraditelný způsob poznání celé lidské společnosti.

### **Literatura:**

- Appleby, M.C., Hughes, B.O. (1997): Introduction. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. *Animal Welfare*, CAB International, Wallingford.
- Ball, R.S. (2006): Issues to consider for preparing ferrets as research subjects in the laboratory. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 47 (4), 348-357.
- Baumans, V. (2005): Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 46 (2), 162-170.
- Bayne, K., Mainzer, H., Dexter, S., Campbell, G., Yamada, F., Suomi, S. (1991): The reduction of abnormal behaviors in individually housed rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with a foraging/grooming board. *American Journal of Primatology*, 23, 23–35.
- Bayne, K., Würbel, H. (2014): The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 33 (1), 273-280.
- Bayne, K.A.L. (2003): Environmental enrichment of nonhuman primates, dogs and rabbits used in toxicology studies. *Toxicologic Pathology*, 3, 132-137.
- Bayne, K.A.L., Strange, G.M., Dexter, S.L. (1994): Influence of food enrichment on cage side preference. *Laboratory Animal Science*, 44, 624–629.
- Blom, H.J.M., Van Tintelen G., Baumans, V., Van den Broek, J., Beynen, A.C. (1995): Development and application of a preference test system to evaluate housing conditions for laboratory rats. *Applied Animal Behaviour Science*, 279-290.
- Bloomsmith, M.A., Brent, L.Y. Schapiro, S.J. (1991): Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates. *Laboratory Animal Science*, 41, 372–377.
- Brain, P.F. (1999): The laboratory gerbil. In: Poole T. *UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Vol. 1. Oxford: Blackwell Science Ltd., 345-355.



- Coleman, K., Bloomsmith, M.A., Crockett, C.M., Weed, J.L., Schapiro, S.J. (2012): Chapter 6. Behavioral Management, Enrichment, and Psychological Well-being of Laboratory Nonhuman Primates. In: Abee, C.R., Mansfield, K., Tardif, S.D., Morris, T. Nonhuman Primates in Biomedical Research, Second Edition, Elsevier, 149-176.
- Dean, S.W. (1999): Environmental enrichment of laboratory animals used in regulatory toxicology studies. *Laboratory Animals*, 33 (4), 309-327.
- Einon, D. (1996): The effects of environmental enrichment in ferrets. *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals. 1965–1995: Birds, Cats, Dogs, Farm Animals, Ferrets, Rabbits and Rodents. AWIC Resource Series No. 2. U.S.A. Department of Agriculture/Universities' Federation for Animal Welfare (UFAW), Beltsville, MD/UK; 113–126.*
- Krohn, T.C., Ritskes-Hoitinga, J., Svendsen, P. (1999): The effects of feeding and housing on the behaviour of the laboratory rabbit. *Laboratory Animals*, 33, 101-107.
- Newberry, R.C. (1995): Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44, 229–243.
- NRC (National Research Council). (1996): *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington DC: National Academy Press.*
- O'Neill-Wagner, P.L., Wright, A.C., Weed, J.L. (1997). Curious response of three monkey species to mirrors. *AAZA Regional Conference Proceedings, Albuquerque, New Mexico*, p 95.
- Olsson, I.A.S., Dahlborn, K. (2002): Improving housing conditions for laboratory mice: A review of 'environmental enrichment'. *Laboratory Animals*, 36 (3), 243-270.
- Poole, T. B. (1988): Normal and abnormal behaviour in captive primates. *Primate report*, 22, 3-12.
- Reinhardt, V. (1994): Comparing the effectiveness of PVC swings versus PVC perches as environmental enrichment objects for caged female rhesus macaques. *Laboratory Primate Newsletter*, 30, 5–6.
- Shepherdson, D. J. (1998): Introduction: tracing the path of environmental enrichment in zoos. In: Shepherdson, D., Mellen, J., Hutchins, M. *Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals. Washington, DC: Smithsonian Institution Press*, 1-12.
- Sherwin, C.M. (2004): Mirrors as potential environmental enrichment for individually housed laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 87, 95-103.

- Van De Weerd, H.A., Van Loo, P.L.P., Van Zutphen, L.F.M., Koolhaas, J.M., Baumans, V. (1997): Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiology and Behavior*, 62 (5), 1019-1028.
- Van Loo, P.L.P., Croes, I.A.A., Baumans, V. (2004): Music for mice: Does it affect behaviour and physiology? Abstract, Telemetry Workshop. FELASA meeting, Nantes, France.
- Van Loo, P.L.P., Kruitwagen, C.L.J.J., Van Zutphen, L.F.M., Koolhaas, J.M., Baumans, V. (2000): Modulation of aggression in male mice: Influence of cage cleaning regime and scent marks. *Animal Welfare*, 9 (3), 281-295.
- Webster, J. (1994): *Animal Welfare - A cool eye towards Eden*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Webster, J. (2006): Animal sentience and animal welfare: What is it to them and what is it to us? *Applied Animal Behaviour Science*, 100, 1-3.
- Young, R.J. (2003). *Environmental enrichment for captive animals*. UFAW Animal Welfare Series. London: Blackwell Science Ltd.
- Zákon č. 246/1992 Sb. ze dne 15. dubna 1992 na ochranu zvířat proti týrání. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 1992, č. 50. s. 1284.
- Vyhláška č. 419/2012 Sb. ze dne 4. prosince 2012 o ochraně pokusných zvířat. In *Sbírka zákonů, Česká republika*, 2012, č. 153., s. 5379.
- Doporučení Komise ES (2007/526/ES), týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně. In: *Úřední věstník Evropské unie* L 197 ze dne 30. 07. 2007, s. 1-89.

### 3.1.2 OBOHACENÍ Z HLEDISKA WELFARE VYBRANÝCH DRUHŮ POKUSNÝCH HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

#### ENRICHMENT IN TERMS OF WELFARE OF SELECTED EXPERIMENTAL FARM ANIMALS SPECIES

**Martin Hostovský\*, Lucie Plhalová, Lenka Večerková, Vladimír Večerek**

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie; Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká  
republika

Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, University of Veterinary and  
Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

#### *Summary*

*In the context of experimental animals using, many questions arise as to the fulfilment or satisfaction of their welfare needs. Farm animals are usually graze and social animals, with many other specific requirements, and should be held in group as far as possible. However, in experimental conditions an animal isolation is often necessary, and the individual can experience fear or stress, which is manifested by many negative consequences for the health and welfare of the animal. One option to prevent stress is environmental enrichment. In experimental cattle, sheep and goats has well proven to use scraping and brushing equipment, feeding systems and toys. Pigs prefer to use items to bite, chew, sniff, and other sensory exploration, including free straw. In experimental equipment for horses a large durable hay or straw bale, plastic containers on ropes or suspended wood items can be placed. The social contact of most animals can be easily replaced by gentle contact with the staff or by enrichment through exercise. The leader of experiment and persons responsible for the care of experimental animals are required to reduce or minimize potential stress and fear in by the way that is in agreement with good scientific ethical principles*

*Key words: experimental animal, cattle, sheep, goats, pigs, horses,, environmental enrichment*

*Souhrn*

*V souvislosti s používáním pokusných zvířat vzniká mnoho otázek ohledně naplnění či uspokojení potřeb jejich welfare. Hospodářská zvířata jsou obvykle stádová a společenská zvířata, s mnoha dalšími specifickými nároky, a pokud je to možné, měla by být umístěna ve skupinách. V podmínkách pokusů je však mnohdy nutná izolace zvířat a chování jedinci mohou zažívat strach či stres, který se projevuje mnoha negativními následky na zdraví a pohodu zvířete. Jednou z možností předcházení stresu je obohacení prostředí. U pokusného skotu, ovcí a koz se velice osvědčuje použití zařízení na škrabání a kartáčování, závěsných systémů na krmení a hraček. Prasata nejraději využívají předměty ke kousání, žvýkání, čichání a dalšímu sensorickému prozkoumávání, včetně volné slámy. Koním v pokusných zařízeních lze zavěšovat velké trvanlivé balíky sena či slámy, plastové nádoby na lanech nebo zavěšené předměty ze dřeva. Sociální kontakt u většiny zvířat lze dobře nahradit šetrným kontaktem s ošetřujícím personálem, nebo obohacením prostřednictvím cvičení. Vedoucí projektů pokusů a osoby zodpovědné za péči o pokusná zvířata mají povinnost omezit nebo minimalizovat potenciální stres a strach způsobem, který je v souladu s dobrými vědeckými etickými zásadami.*

*Klíčová slova: pokusné zvíře, skot, ovce, kozy, prasata, koně, obohacení prostředí*

*\*hostovskym@vfu.cz*

## **Úvod**

Použití pokusných zvířat, včetně zvířat hospodářských druhů, je přijatelné pouze v případě, že jsou používána pro vědecké nebo vzdělávací účely. Pokusy musí přispívat k pochopení základních biologických, behaviorálních nebo zemědělských poznatků, které mohou být přínosem pro lidi, zvířata nebo ekosystémy. Při používání pokusných zvířat vzniká mnoho otázek ohledně naplnění či uspokojení potřeb jejich welfare. Dobré životní podmínky zvířete jsou současným stavem zvířete, pokud jde o jeho vztah se všemi faktory prostředí. To předpokládá pozitivní psychický stav, zdárnou biologickou funkci, pozitivní zkušenosti a svobodu před nepříznivými podmínkami (Webster, 1994; Appleby and Hughes, 1997). Velký vliv na welfare zvířete v pokusech má obohacení chovu, které je jedním z prostředků, jak zajistit zvířeti dobré životní podmínky.

Požadavky na obohacení u pokusných zvířat vyplývají ze zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, jehož prováděcím předpisem vztahujícím se k pokusným zvířatům je vyhláška č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů. Doporučení Komise ES (2007/526/ES), týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně, uvádí obecná

doporučení na ustájení a obohacení prostředí, která jsou v dalších oddílech konkretizována pro jednotlivé druhy pokusných zvířat, včetně hospodářských druhů.

Téma obohacení chovu pokusných zvířat je zakomponováno rovněž do procesu hodnocení žádosti o schválení projektu pokusů, které začíná již na úrovni uživatelského zařízení. Všechny projekty pokusů zahrnující používání zvířat pro vědecké či vzdělávací účely musí být přesně popsány v žádosti o projekt pokusů (formulář žádosti podle § 5 vyhlášky č. 419/2012 Sb., viz Příloha č. 4) a musí být před zahájením pokusu schváleny komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat uživatelského zařízení a dále příslušným orgánem ke schvalování projektů pokusů. V této žádosti je třeba dobře definovat podmínky umístění a chovu pokusných zvířat, ale také obohacení prostředí pokusných zvířat (bod 17. žádosti o projekt pokusů).

Tato práce podává základní přehled možností obohacení u vybraných druhů hospodářských zvířat. Popsány jsou možnosti obohacení chovu skotu, ovcí, koz, prasat a koní v podmínkách pokusů.

### **Obecná hlediska obohacení welfare pokusných zvířat**

Obohaceným chovem zvířat je takový princip chovu, který se snaží zvýšit kvalitu péče o zvířata v zajetí poskytováním různých podnětů, které jsou nezbytné pro optimální fyziologickou a psychickou pohodu zvířat (Webster, 1994, 2006). Obohacení ovlivňuje mnoho zřetelů repertoáru chování a biologie jedince, ty se nejčastěji dají rozdělit do pěti obecných, avšak vzájemně se překrývajících kategorií (Coleman et al., 2012, Hostovský et al., 2016):

- 6) Sociální obohacení – zahrnuje přímý nebo nepřímý kontakt s ostatními jedinci stejného druhu nebo s lidmi. Tento kontakt může být vizuální, čichový, sluchový či taktilní.
- 7) Obohacení náplně zvířete - zahrnuje jak psychologické obohacení (například zařízení, která poskytují zvířatům možnost kontroly nad prostředím) a obohacení, které podněcuje cvičení a fyzickou aktivitu.
- 8) Obohacení prostředí – může zahrnovat změnu velikosti, uspořádání či členitosti životního prostředí zvířete, anebo přidání dalšího příslušenství do prostoru (substráty, trvalé konstrukce), které může zvíře využít.
- 9) Smyslové obohacení – zvířeti jsou dopřány podněty vizuální (televize), sluchové (hudba, vokalizace) nebo v dalších formách (čichové, taktilní, chuťové).
- 10) Nutriční obohacení – zvířeti jsou podávány rozmanité či nové typy či druhy krmiva, eventuálně je změněn způsob podávání krmiva.

Z vědeckého hlediska musí být systém obohacení chovu pokusných zvířat slučitelný s projektem pokusů a rovněž s oprávněním pro dané uživatelské či dodavatelské zařízení. Nejdůležitějšími pravidly jsou, aby jídlo, substrát nebo hračka byly kompatibilní s cílem dané studie a vlastním projektem. Je rovněž nutné, aby bylo možné použité materiály a krmiva chemicky definovat a nesmí ohrožovat zdraví zvířat ani ošetřujících osob. Dále by nemělo použití obohacujících prostředků znamenat neúnosné zatížení personálu nebo narušení režimu zvířetníku. V neposlední řadě by nemělo být obohacení příčinou neúměrných ekonomických nákladů (Young, 2003; FASS, 2010; Coleman et al., 2012). Velkou výhodou a přínosem aplikace správných obohacujících prvků v pokusech s hospodářskými zvířaty je předcházení stereotypním behaviorálním vzorcům, možnost vyjádření druhově typických chování a přiblížení k přirozeným podmínkám prostředí u chovaných zvířat. Obohacením welfare pokusných zvířat se tak fakticky zkvalitní a zpřesní proces tvorby výzkumných dat a poznatků (Bayne and Würbel, 2014; Hostovský et al., 2016).

### **Obohacení u jednotlivých druhů hospodářských zvířat v podmínkách pokusů**

#### **Možnosti obohacení zařízení pro pokusný skot**

Skot byl domestikovaný člověkem po několik tisíc let a v současné době se používá ve velkém množství jako zdroj masa nebo mléka, a rovněž proto se do pokusů zařazuje. Výsledkem dlouhého a úzkého kontaktu s člověkem je mnoho praktických znalostí v chovu, transportu, péči a manipulaci s těmito významnými hospodářskými zvířaty. Skot je společenské zvíře, které vytváří pevné hierarchické struktury na základě dominantních vztahů mezi členy stáda. Stejně jako ostatní přežvýkavci, skot tráví většinu dne hledáním potravy a přežvykáním. Skot je většinou přizpůsobivý a dobře přivyká lidskému kontaktu a manipulaci. Rohatý a bezrohý skot by neměl být ustájen dohromady (Doporučení 2007/526/ES; Grandin, 2007).

#### *Sociální obohacení*

Pro skot je z hlediska optimální pohody skupinové ustájení, ovšem mnohdy to podmínky pokusu nedovolí, a tak je žádoucí alespoň dodržet vizuální a sluchový kontakt s jedinci stejného druhu. Pokud není možný sociální kontakt mezi zvířaty, lze jej nahradit kontaktem s člověkem – osobami zodpovědnými za péči o zvířata (FASS, 2010). Odborné a citlivé zacházení se skotem obecně zlepšuje pohodu zvířat, ale také produkci. Pokud člověk stimuluje skot drbáním na místech, které jsou běžně ošetřovány jiným skotem, jako je krk, se zvířaty je poté lepší

manipulace (Schmied et al., 2008). Naopak hrubé a agresivní chování, je pro dobytek stresující a proti principům správného welfare hospodářských zvířat (Pajor et al., 2000, 2003; Grandin, 2007).

### *Obohacení náplně a prostředí*

V případě projektů pokusů, které využívají vazného ustájení skotu, by se rovněž mělo aplikovat časté vyvedení zvířat na volný prostor. Dále se u všech kategorií osvědčilo použití zařízení na škrabání a kartáčování, která jsou skotem nejvíce preferována (Wilson et al., 2002; FASS, 2010).

### *Nutriční obohacení*

Krmení a napájení skotu by mělo odpovídat nárokům dané kategorie a užitkovosti zvířat. V podmínkách pokusů jsou často zařazována nová krmiva a krmné doplňky, které svou chutností mohou sloužit jako forma nutričního obohacení. Při možnostech výběhu se rovněž dá využít obohacení pastvou skotu, která je prospěšná pro všechna zvířata, jež mají následně méně zdravotních problémů, jako je např. mastitida (Washburn et al., 2002), a nevykazují rovněž stereotypní chování (Redbo and Nordblad, 1997).

### *Senzorické obohacení*

Skot obecně preferuje spíše tiché a klidné prostředí, kdy naopak nové a hlasité zvukové podmínky působí spíše stresově. Tiché prostředí usnadňuje manipulaci se zvířaty a je podmínkou dobrých životních podmínek (Doporučení 2007/526/ES). Zajímavé je užití aromatizačních zařízení (vůně mléka nebo levandule), ovšem v porovnání se zařízeními pro škrabání je zvířata využívají méně (Wilson et al., 2002). Zajímavá je pozitivní stimulace dojného skotu při zaznamenání zvuků automatického dojícího zařízení.

## **Možnosti obohacení zařízení pro pokusné ovce a kozy**

Ovce a kozy domácí jsou přirozeně velmi zvědavá zvířata, která žijí obvykle v sociálních skupinách a sociální izolace je pro ně stresující. Obvyklý hospodářský chov za účelem získání masa, mléka nebo rouna je pastevním způsobem, v podmínkách pokusů by na volnost pohybu a sociální kontakt měl být brán velký zřetel. Zvířata si dobře navykají na manipulaci a obvyklé činnosti s pokusnými zvířaty, existují však poměrně velké rozdíly mezi plemeny (Doporučení 2007/526/ES; Grandin, 2007).

### *Sociální obohacení*

Ovce i kozy jsou sociální zvířata a lze je jen výjimečně chovat samostatně (Vyhláška 208/2004 Sb.). Pokud je však nutné omezit společenský kontakt zvířat, z hlediska schváleného projektu pokusů, je vhodné poskytnout ovcím či kozám vizuální kontakt s jinými zvířaty prostřednictvím oplocení nebo jiných průhledných materiálů. Používání zrcadel či jiných prostředků se neukázalo být dostatečně efektivní z hlediska fyziologických projevů stresové reakce (Parrott et al., 1988). Částečnou náhradou může být kontakt s ošetřovatelem, avšak pro ovce i kozy platí, že akceptování kontaktu s člověkem je pro některá plemena specifický (FASS, 2010).

### *Nutriční obohacení*

Zařazení složek do krmné dávky pokusných ovcí a koz je řízeno nároky vlastních pokusů. Důležité z hlediska obohacení mohou být formy, kterými je potrava předkládána (pelety, sypká směs, nezpracované obilniny), dále možnosti využití krmítek (nádoby s otvory, krmelce atd.) a rovněž frekvence, kdy jsou zvířata krmena (pravidelný režim nebo střídání v různých intervalech, či *ad libitum*). Velice zvědavé ovce či kozy ocení zejména možnost okusování a „dobývání“ potravy ze zásobníků. Zvýšení obsahu hrubé vlákniny v krmivu či peletách může snížit výskyt vykusávání vlny u ovcí (Vasseur et al., 2006).

### *Pracovní a fyzické obohacení*

Jako následek nedostatku simulace prostředí se u ovcí a koz mohou projevovat některé stereotypie, či patologie v chování, jako je například u ovcí vykusování vlny (Vasseur et al., 2006). Obohacením prostředí o různé závěsné systémy na krmení, hračky (např. košíky ze sena a proutí, plastové lahve nebo žvýkácké tyčinky) anebo vyvýšené plošiny zvyšuje pohodu chovaných zvířat, která tyto prvky využívají po celý den. Bylo prokázáno, že obohacené prostředí má pozitivní vliv na spotřebu krmiva a snižuje rovněž agresivitu u koz (Flint a Murray, 2001).

### **Možnosti obohacení zařízení pro pokusná prasata**

Přestože prase domácí prošlo po mnoho generací intenzivní domestikací, zejména pro produkci masa, zachovala si domestikovaná prasata z velké části stejné charakteristiky chování jako jejich předek, prase divoké. Jsou to velice zvědavá a bystrá zvířata se silně vyvinutým průzkumným chováním. Šlechtěním vznikla řada různých linií miniprasat pro získání malého prasete jako laboratorního zvířete vhodného pro výzkumné účely. Velký důraz v chovu prasete,



jako pokusného zvířete, by měla být kladen na obohacené chovné prostory, rozmanité prostředí a poskytnutí prostředků k uspokojení jejich etologických potřeb (Doporučení 2007/526/ES; Grandin, 2007).

### *Sociální obohacení*

Pro prasata je z hlediska welfare nejpřirozenější skupinové ustájení. Prasata by neměla být nikdy ve vazném ustájení a neměla by být uzavřena v boxech nebo klecích, kromě krátké doby nezbytné pro krmení, inseminaci, veterinární nebo pokusné účely (Doporučení 2007/526/ES). Rovněž v podmínkách pokusů či pro ustájení prasat pro výukové účely je nejvhodnější vytvořit pro stabilní sociální skupiny dostatečný prostor s obohaceným prostředím, které jim poskytne možnost projevit přirozené chování a lépe se přizpůsobit změnám či stresu. Pokud musí být pro pokusné účely prasata izolována, je třeba zachovat vizuální kontakt s ostatními prasaty, nebo je rovněž vhodné sociální kontakt nahradit klidným škrabáním či drbáním ošetřujícími osobami (Parratt et al., 2006). Pokud ošetřovatelé aplikují pozitivní a klidný přístup ke zvířatům, prasata si velmi snadno zvyknou a následná manipulace je tak snadnější.

### *Obohacení prostředí a náplně*

Prasata obecně velice dobře přijímají a využívají obohacení prostředí. Prasata musí mít trvalý přístup k dostatečnému množství materiálu, který jim umožňuje etologické aktivity, jako je sláma, seno, dřevo, piliny, houbový kompost, rašelina nebo směsi takových materiálů, které neohrožují zdraví zvířat (Vyhláška 208/2004 Sb.). V pokusech se tak předchází stereotypnímu a agresivnímu chování, zejména ve větších skupinách zvířat. Nejraději využívají předměty ke kousání, žvýkání, čichání a dalšímu sensorickému prozkoumávání. Velice užitečná je hrubá sláma, kterou zvířata dobře využívají k rytí či tvorbě hnízda-lože u prasnic. Dlouhá sláma je užitečným obohacovacím materiálem, který je efektivnější než např. nasekaná sláma, písek nebo lana a mnohem účinnější než nezníčitelné předměty, jako jsou hadice, řetězy a pneumatiky. Poskytování slámy selatům pomáhá předcházet kousání ocasu, snižuje agresivitu a udržuje aktivitu zvířat (Chaloupková et al., 2007; Zonderland et al., 2008). Sláma se ovšem nedá použít v systému bezstelivového roštového chovu. Všechny použité předměty pro obohacení musí být zdravotně nezávadné, velice odolné a rovněž by se měly často obměňovat, neboť o ně zvířata rychle mohou ztrácet zájem. Obohacovací materiály a předměty by měly být ošetřovateli sledovány, aby se zajistilo, že nezpůsobí zdravotní potíže, jako jsou např. uškrcení, udušení, otravy, obstrukce zažívacího traktu nebo přenos patogenů (Doporučení 2007/526/ES; FASS, 2010, Machado et al., 2017).

### *Nutriční obohacení*

Obohacení výživy prasat se řídí vlastními nutričními nároky během vlastního pokusu. Zařazení vyššího podílu hrubé vlákniny (sláma, traviny, seno) či vyšší obsah fermentovatelných neškrobových polysacharidů do krmné dávky se však projevilo pozitivně v poklesu stereotypního a agresivního chování (de Leeuw et al., 2005; Studnitz et al., 2007) a rovněž mělo za následek snížený výskyt žaludečních lézí (Bolhuis et al., 2007). Frekvence podávání krmiva je rovněž velmi důležitá, neboť například ve skupinovém chovu jsou časté šarvátky v období krmení, a proto by mělo být koncentrované krmivo podáváno prasatům spíše jednou až dvakrát denně, či *ad libitum* (FASS, 2010, Machado et al., 2017).

### *Senzorické obohacení*

Prasata mají velmi vyvinuté smysly a mohou naučit spojovat čichové, zvukové a vizuální znamení s odměnou za potravu. Jejich výborný čich se používá k hledání lanýžů (zápach dimethylsulfidu). Senzorická znamení spojené s odměnami spolu s obohacením prostředí, mohou být použity ke stimulaci a zabavení zvířat jako prevence stereotypního chování (Puppe et al., 2007). Senzorické podněty prostředí mohou pozitivně sloužit k uklidnění a zabavení pokusných prasat, ale mohou mít rovněž za následek stres. Neznámé a příliš výrazné pachy čisticích prostředků a desinfekčních chemikálií v režimu zajištění hygieny uživatelských zařízení narušují pohodu těchto vnímavých zvířat (Van de Weerd et al., 2003; Machado et al., 2017). U prasat je rovněž důležitá vokální komunikace, zejména mezi prasnicí a selat. Prasata by měla být manipulována způsobem, který minimalizuje hlasité vokalizace, které signalizují utrpení selat a rušení prasnic (Grandin, 2007).

### **Možnosti obohacení zařízení pro pokusné koně**

Koně se vyvinuli jako pastevní zvířata, pro které jsou přirozené otevřené travnaté stepi. Systémy chovu koní jako pokusných zvířat by měly přihlížet k jejich přirozenému chování, zejména k potřebě pastvy, pohybu a vytváření sociálních vztahů. Koně jsou obecně velmi lekavá zvířata a náhlé stresující faktory v nich vyvolávají poplašení a přirozenou útekovou či obrannou reakci. Při nepřítomnosti obohacujících podnětů mohou často koně vykazovat behaviorální stereotypy (Doporučení 2007/526/ES; Hill, 2007; Merkies et al., 2014).

### *Sociální obohacení*

Kůň je přirozeně stádovým zvířetem, které žije v silných sociálních vazbách. Během pokusů, kdy koně musí být odděleni, tak může dojít ke zneklidnění, úzkosti a akutním stresovým stavům, které ohrožují zdraví zvířete i ošetřujících osob. Manipulace či zákroky na takovém zvířeti jsou pak prakticky velmi nesnadné. Dlouhodobá izolace pak vede ke vzniku behaviorálních problémů (deprese nebo agrese), které někdy vyústí ve stereotypní chování, běžně se označující jako zlozvyky. Jednou z možností náhrady jedinců vlastního druhu je kontakt s proškoleným personálem zvířetníku. Pravidelným cvičením, kontaktem (škrabání, čištění srsti, hlazením) nebo hrou mohou tyto činnosti částečně nahradit sociální interakce koní ve stádě či skupině (Henry et al., 2006; Doporučení 2007/526/ES; FASS, 2010; Sondergaard and Jago, 2010). Další možností náhrady sociálních vazeb stáda je přítomnost jiných zvířat (poník, koza, kočka, pes). Toto obohacení je však v podmínkách pokusných zařízení mnohdy problematické aplikovat.

#### *Obohacení prostředí a náplně*

Pro koně je přirozený pohyb ve volných prostorech i na velké vzdálenosti. Pokud podle podmínek pokusu nemůžeme poskytnout koním volný pohyb na pastvině či ve výběhu, musíme se snažit obohatit jim alespoň prostředí. Lze k dispozici několik komerčně dostupných produktů - hraček, jako jsou velké trvanlivé balíky sena či slámy, plastové nádoby visící na laněch nebo zavěšené předměty ze dřeva. Zajímavé jsou pro koně také pelety a hračky s vysokým obsahem vlákniny. Koně ustájení na podestýlce ze slámy vykazují méně stereotypní chování než ti, kteří jsou na hoblinách či papírové drti (Cooper et al., 2005; Hill, 2007).

#### *Senzorické obohacení.*

Pro zmírnění stresových zvukových podnětů z okolí se může použít rádio, nebo jiné zdroje tlumeného zvuku, na koně ovšem obvykle tento typ simulace nepůsobí (Houpt et al., 2000), důležitý je spíše klidný a ne příliš hlasitý přístup ošetřovatelů (Merkies et al., 2014). Zajímavé je použití zdrojů syntetických feromonů, které mají vliv na snížení behaviorální a fyziologické odpovědi na stresové situace u koní (Falewee et al., 2006).

#### *Nutriční obohacení*

V podmínkách pokusu lze základní krmnou dávku pro koně obohatit spíše formou a frekvencí podávaného krmiva, kdy můžeme podávání potravy rozdělit do menších dávek po celý den a seno zavěsit do vaků či umístit po boxu tak, aby kůň musel zvýšit aktivitu pro jeho získání (Cooper et al., 2005; Hill, 2007). Stejně jako další hospodářská zvířata, koně obvykle

přirozeně tráví velkou část dne na pastvě, pokud to tedy podmínky pokusu dovolí, je pro ně pastva cenným obohacením.

## **Závěr**

Použití hospodářských zvířat v pokusech má důležitá specifika v porozumění jejich přirozenému chování a aplikaci poznatků v obohacení pokusných zařízení. Hospodářská zvířata jsou často stádová zvířata, která pro chov vyžadují velké prostory, mají nároky na sociální kontakt a na stres mohou reagovat přirozeně útekem či útokem na ošetřující osoby. Pokud se nedodrží alespoň základní požadavky na prostor a obohacení hospodářských zvířat v pokusech, hrozí riziko stereotypního či agresivního chování. Obohacení však musí odpovídat podmínkám projektu pokusů v rámci dodržení hygieny a praktičnosti v zařízení a nemělo by neúměrně zatěžovat pokus ekonomickými či personálními nároky. V současné době by mělo být obohacení pro pokusná zvířata samozřejmostí, nejen z hlediska vědecké morální a etické zodpovědnosti, ale také z hlediska samotného vnímání člověka přirozeným nárokům zvířat.

## **Literatura:**

- Appleby, M.C., Hughes, B.O. (1997): Introduction. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. *Animal Welfare*, CAB International, Wallingford.
- Bayne, K., Würbel, H. (2014): The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 33 (1), 273-280.
- Bolhuis, J. E., van den Brand, H., Staals, S., Gerrits, W.J.J. (2007): Effects of pregelatinized vs. native potato starch on intestinal weight and stomach lesions of pigs housed in barren pens or on straw bedding. *Livestock Science* 109:108–110.
- Coleman, K., Bloomsmith, M.A., Crockett, C.M., Weed, J.L., Schapiro, S.J. (2012): Chapter 6. Behavioral Management, Enrichment, and Psychological Well-being of Laboratory Nonhuman Primates. In: Abee, C.R., Mansfield, K., Tardif, S.D., Morris, T. *Nonhuman Primates in Biomedical Research*, Second Edition, Elsevier, 149-176.
- Cooper, J. J., McCall, N., Johnson, S., Davidson, H.P.B. (2005): The short-term effects of increasing meal frequency on stereotypic behaviour of stabled horses. *Applied Animal Behaviour Science* 90:351–364.
- de Leeuw, J. A., Zonderland, J.J., Altena, H., Spoolder, H.A.M., Jongbloed, A.W., Verstegen, M.W.A. (2005): Effects of levels and sources of dietary fermentable non-starch

- polysaccharides on blood glucose stability and behaviour of group-housed pregnant gilts. *Applied Animal Behaviour Science* 94:15–29.
- Falewee, C., Gaultier, E., Lafont, C., Bougrat, L., Pageat, P. (2006): Effect of a synthetic equine maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation. *Applied Animal Behaviour Science* 101:144–153.
- FASS - Federation of Animal Science Societies (2010): Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching (FASS Ag Guide)
- Flint, M., Murray, P.J. (2001): Lot-fed goats—The advantages of using an enriched environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41:473–476.
- Grandin, T. (2007): Livestock handling and transport. 3rd ed. CABI:Wallingford: 496 pp.
- Henry, S., Richard-Yris, M.A., Hausberger, M. (2006): Influence of various early human-foal interferences on subsequent human-foal relationship. *Developmental Psychobiology* 48:712–718.
- Hill, J. (2007): Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilisation. *Animal Feed Science And Technology* 138(2): 92-117.
- Hostovský, M., Plhalová, L., Jozefová, J. (2016): Obohacení u pokusných zvířat z pohledu welfare pokusných hlodavců, králíků, fretek a subhumánních primátů. (Enrichment in experimental animals in terms of welfare of experimental rodents, rabbits, ferrets, and non-human primates). In *Ochrana zvířat a welfare 2016*, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, p. 118-126.
- Houpt, K., Houpt, T.R., Johnson, J.L., Erb, H.N. Yeon, S.C. (2001): The effect of exercise deprivation on the behaviour and physiology of straight stall confined pregnant mares. *Animal Welfare* 10:257–267.
- Chaloupková, H., Illmann, G., Bartoš, L., Špinka, M. (2007): The effect of pre-weaning housing on the play and agonistic behaviour of domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 103:25–34.
- Machado, S.P., Caldara, F.R., Foppa, L., de Moura, R., Goncalves, L.M.P., Garcia, R.G., Naas, I.D., Nieto, V.M.O.D., de Oliveira, G.F. (2017): Behavior of Pigs Reared in Enriched Environment: Alternatives to Extend Pigs Attention. *PLOS ONE* 12(1): Article Number: e0168427
- Merkies, K., Sievers, A., Zakrajsek, E., MacGregor, H., Bergeron, R., von Borstel, U.K. (2014): Preliminary results suggest an influence of psychological and physiological stress in humans

- on horse heart rate and behavior. *Journal Of Veterinary Behavior-Clinical Applications And Research* 9(5): 242-247.
- Pajor, E.A., Rushen, J., de Passillé, A.M.B. (2000): Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Applied Animal Behaviour Science* 69:89–102.
- Pajor, E.A., Rushen, J., de Passillé, A.M.B. (2000): Dairy cattle's choice of handling treatments in a Y-maze. *Applied Animal Behaviour Science* 80:93–107.
- Parratt, C.A., Chapman, K.J., Turner, C., Jones, P.H., Mendl, M.T., Miller, B.G. (2006): The fighting behaviour of piglets mixed before and after weaning in the presence or absence of a sow. *Applied Animal Behaviour Science* 101:54–67.
- Parrott, R.F., Houpt, K.A., Mission, B.H. (1988): Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. *Applied Animal Behaviour Science* 19:331–338.
- Redbo, I., Nordblad, A. (1997): Stereotypies in heifers are affected by feeding regime. *Applied Animal Behaviour Science* 53:193–204.
- Schmied, C., Boivin, X., Waiblinger, S. (2008): Stroking different body regions of dairy cows: Effects on avoidance and approach behavior toward humans. *Journal of Dairy Science* 91: 596–605.
- Sondergaard, E., Jago, J. (2010): The effect of early handling of foals on their reaction to handling, humans and novelty, and the foal-mare relationship. *Applied Animal Behaviour Science* 123(3-4): 93-100.
- Studnitz, M., Jensen, M.B., Pedersen, L.J. (2007): Why do pigs root and in what will they root?: A review on the exploratory behaviour of pigs in relation to environmental enrichment. *Applied Animal Behaviour Science* 107:183–197.
- Van de Weerd, H. A., Docking, C.M., Day, J.E.L., Edwards, S. A. (2005): The development of harmful social behaviour in pigs with intact tails and different enrichment backgrounds in two housing systems. *Animal Science Journal* 80:289–298.
- Vasseur, S., Paull, D.R., Atkinson, S.J., Colditz, I.G., Fisher, A.D. (2006): Effects of dietary fibre and feeding frequency on wool biting and aggressive behaviours in housed Merino sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46:777–782.
- Washburn, S.P., White, S.L., Green, J.T., Benson, G.A. (2002): Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science* 85:105–111.
- Webster, J. (1994): *Animal Welfare - A cool eye towards Eden*. Blackwell Science, Oxford, UK.

Webster, J. (2006): Animal sentience and animal welfare: What is it to them and what is it to us? *Applied Animal Behaviour Science*, 100, 1-3.

Wilson, S.C., Mitlöhner, F.M., Morrow-Tesch, J., Dailey, J.W., McGlone, J.J. (2002): An assessment of several potential enrichment devices for feedlot cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 76:259–265.

Young, R.J. (2003). *Environmental enrichment for captive animals*. UFAW Animal Welfare Series. London: Blackwell Science Ltd.

Zonderland, J. J., Wolthuis-Fillerup, M., van Reenen, C.G., Bracke, M.B.M., Kemp, B., den Hartog, L.A., Spoolder, H.A.M. (2008): Prevention and treatment of tail biting in weaned piglets. *Applied Animal Behaviour Science* 110:269–281.

Doporučení Komise ES (2007/526/ES), týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně. In: *Úřední věstník Evropské unie* L 197 ze dne 30. 07. 2007, s. 1-89.

Zákon č. 246/1992 Sb. ze dne 15. dubna 1992 na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 1992, č. 50. s. 1284.

Vyhláška č. 419/2012 Sb. ze dne 4. prosince 2012 o ochraně pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů. In *Sbírka zákonů, Česká republika*, 2012, č. 153., s. 5379.

Vyhláška č. 208/2004 Sb. Ze dne 14. dubna 2004, o minimálních standardech pro ochranu hospodářských zvířat, ve znění pozdějších předpisů. In *Sbírka zákonů, Česká republika*, 2004, č. 69., s. 3241.

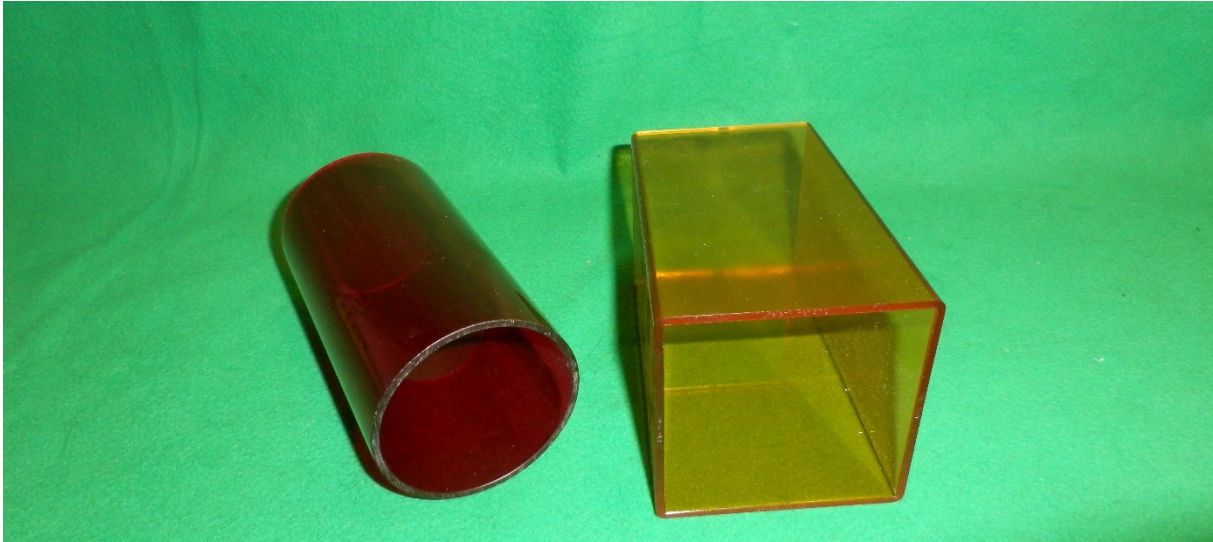
## 4 OBRAZOVÁ PŘÍLOHA (*Zmenšena*)

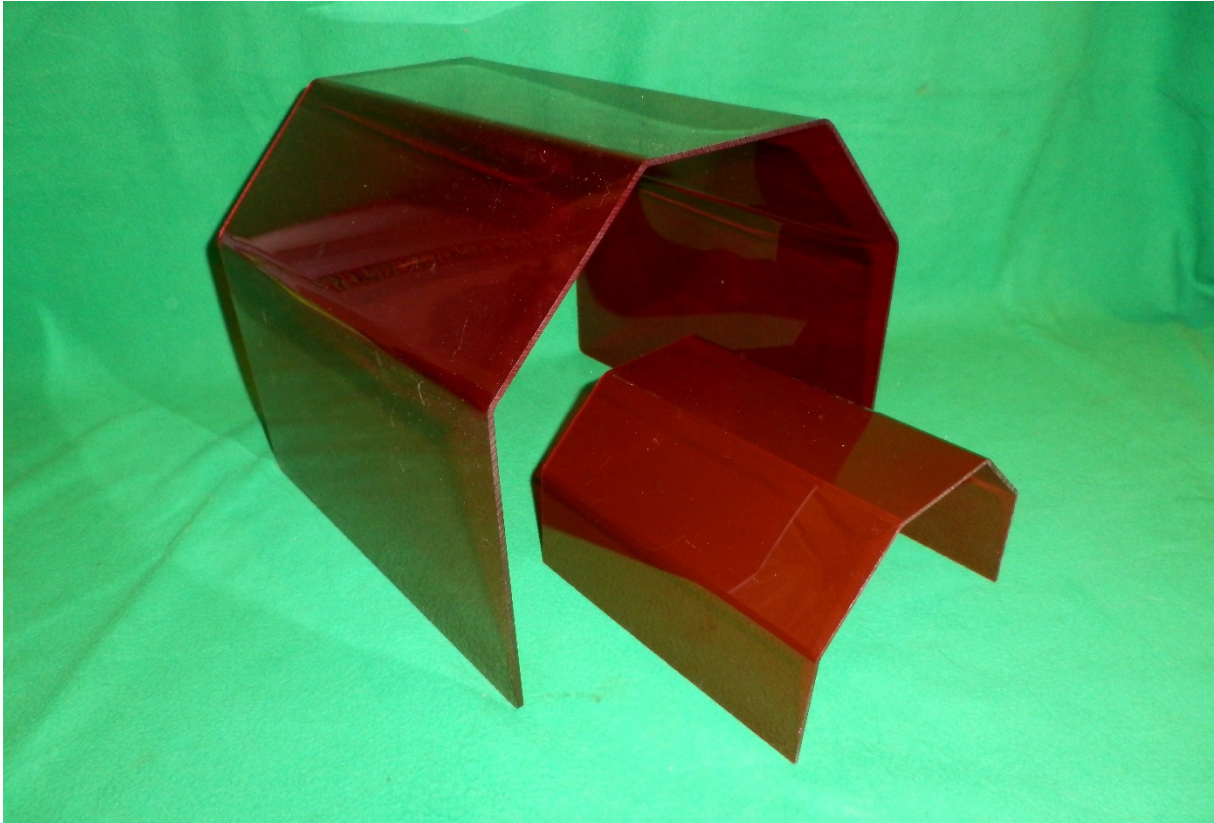


## 4.1 OBOHACENÍ WELFARE POKUSNÝCH HLODAVCŮ

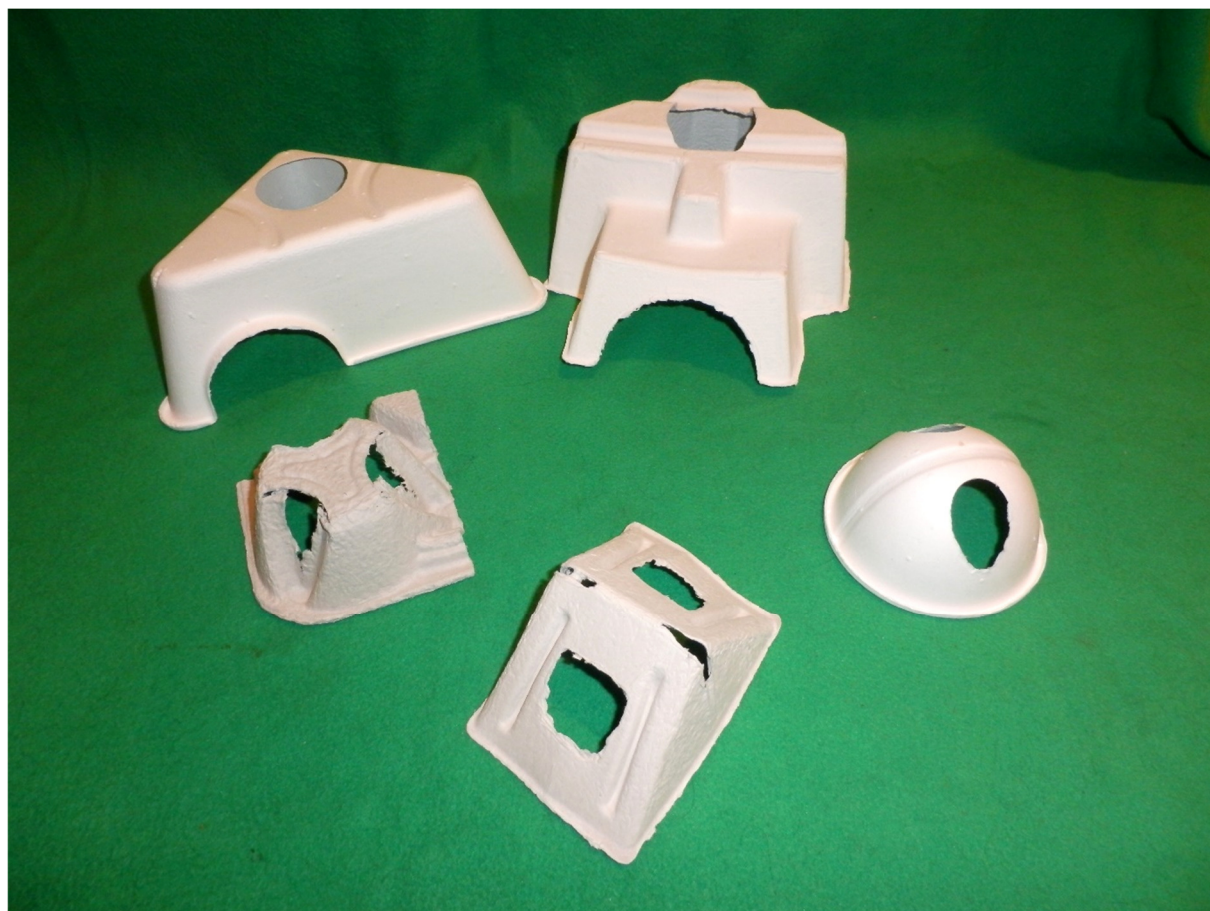
### 4.1.1 DOMKY PRO KRÁLÍKY HLODAVCE Z PEVNÝCH MATERIÁLŮ







#### 4.1.2 JEDNORÁZOVÉ DOMKY PRO HLODAVCE



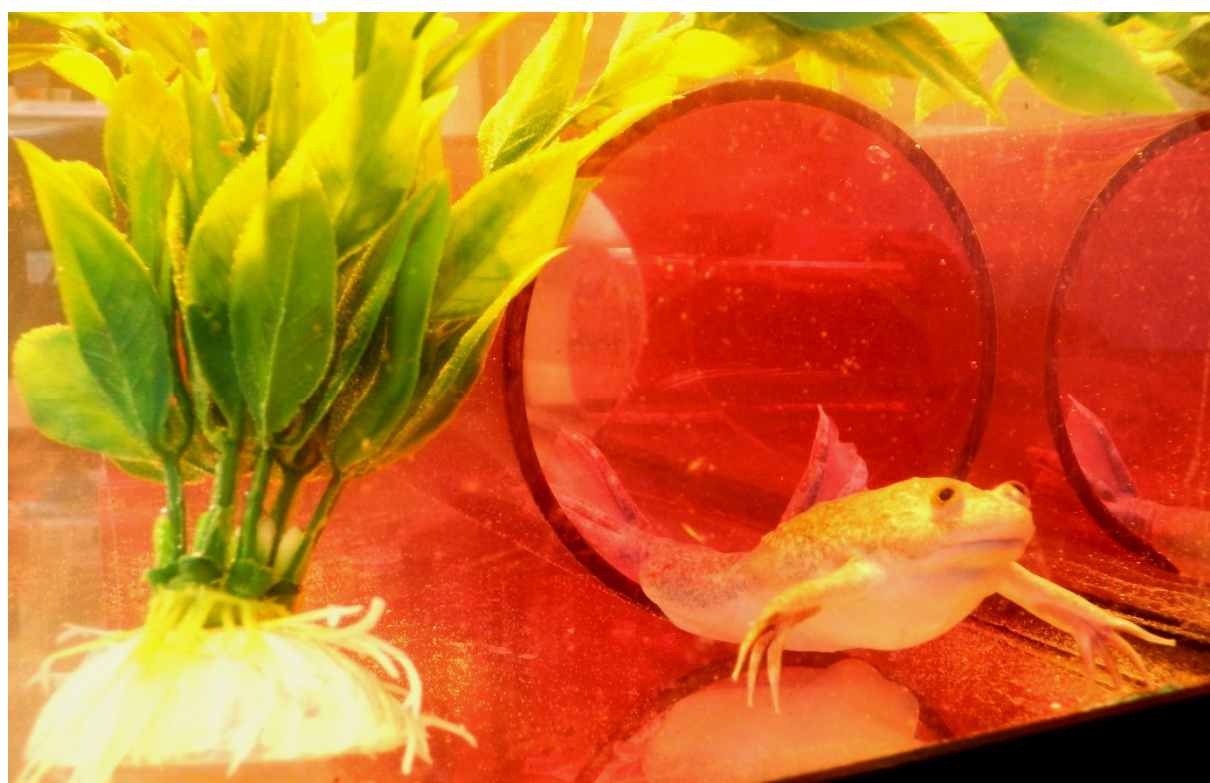
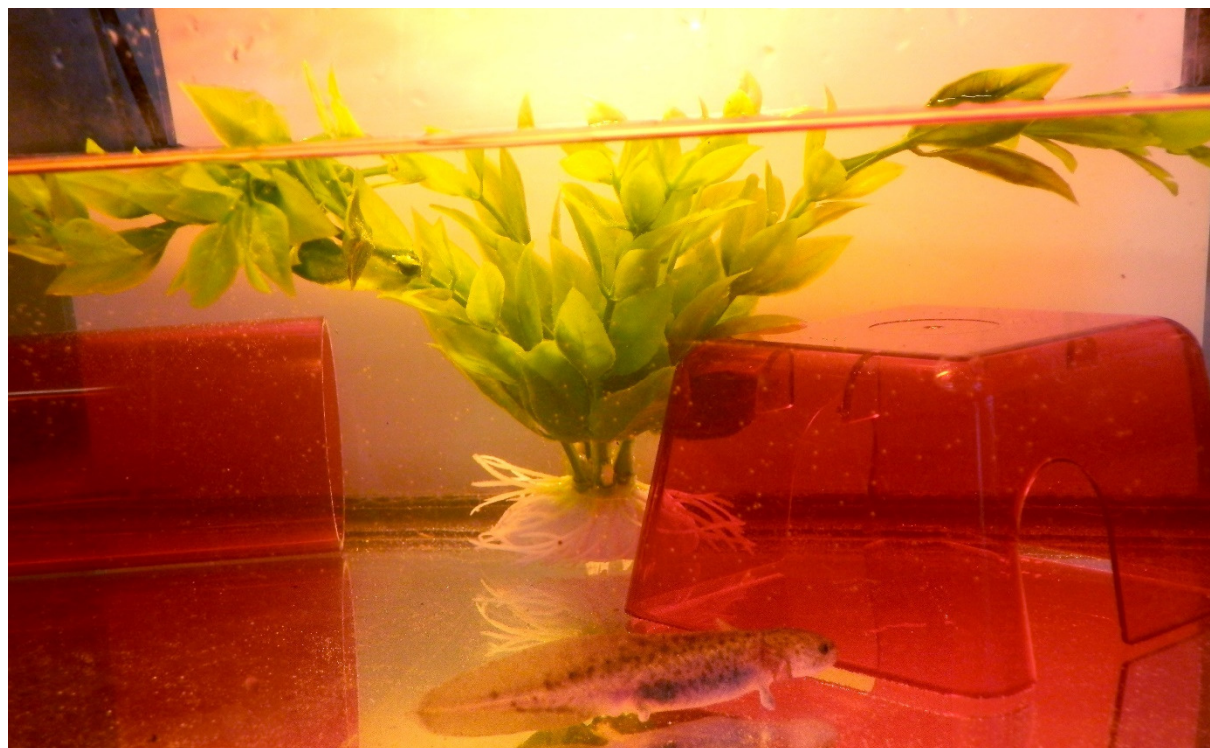
#### 4.1.3 HNÍZDNÍ MATERIÁLY PRO HLODAVCE



#### 4.1.4 PŘEDMĚTY NA OKUSOVÁNÍ



## 4.2 OBOHACENÍ WELFARE POKUSNÝCH OBOJŽIVELNÍKŮ

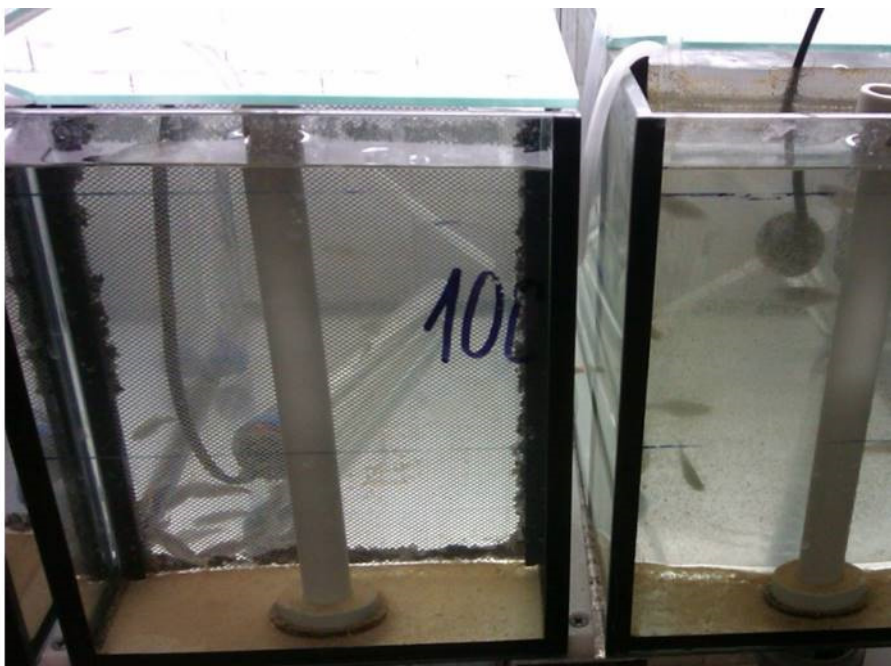






### 4.3 PŘÍKLADY ZAŘÍZENÍ PRO CHOV POKUSNÝCH ZVÍŘAT





5 POZNÁMKY K PŘEDNÁŠKÁM Z PŘEDMĚTU  
WELFARE POKUSNÝCH ZVÍŘAT A POKUSY NA  
ZVÍŘATECH (H6WV)