

Univerza  
v Ljubljani *Veterinarska*  
fakulteta



Nina Čebulj Kadunc  
Monika C. Žužek

**LABORATORIJSKE VAJE IN RAČUNALNIŠKE SIMULACIJE V  
FIZIOLOGIJI**  
**1. del: Splošna fiziologija, fiziologija regulacijskih procesov,  
prebave in metabolizma**

Učbenik za študente veterinarske medicine

LJUBLJANA, 2014

**LABORATORIJSKE VAJE IN RAČUNALNIŠKE SIMULACIJE V FIZIOLOGIJI**  
**(1. del: Splošna fiziologija, fiziologija regulacijskih procesov, fiziologija prebave in metabolizma)**

Učbenik za študente veterinarske medicine

Avtorici: Nina Čebulj Kadunc, Monika C. Žužek

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Strokovna recenzija:

Prof.dr. Martina Klinkon-Ogrinec, dr.vet.med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Prof.dr. Robert Frangež, dr.vet.med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Lektorica: prof. Ivanka Šircelj-Žnidaršič

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

636.1/.9:612(075.8)(0.034.2)

ČEBULJ-Kadunc, Nina

Laboratorijske vaje in računalniške simulacije v fiziologiji [Elektronski vir] :  
učbenik za študente veterinarske medicine. Del 1, Splošna fiziologija, fiziologija  
regulacijskih procesov, prebave in metabolizma / Nina Čebulj Kadunc, Monika C.  
Žužek. - El. knjiga. - Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2014

ISBN 978-961-6199-70-4 (pdf)

1. Žužek, Monika C.

276688384

## KAZALO

1 SPLOŠNA FIZIOLOGIJA.....	5
1.1 UPORABA MERSKIH ENOT IN VELIČIN V FIZIOLOGIJI .....	5
1.1.1 Koncentracija snovi .....	5
1.1.2 Katalitična aktivnost encimov .....	7
1.1.3 Fizikalne enote, ki se uporabljajo v fiziologiji.....	7
1.2 APARATI IN POSTOPKI V FIZIOLOGIJI.....	10
1.2.1 Osnovne registracije v fiziologiji.....	10
1.2.2 Centrifuge in centrifugiranje.....	13
1.2.3 Avtomatske pipete in pipetiranje .....	15
1.3 POSKUSNE IN LABORATORIJSKE ŽIVALI.....	16
1.3.1 Splošna načela o ravnanju s poskusnimi živalmi .....	16
1.3.2 Področja uporabe in razdelitev poskusnih živali.....	17
1.4 MEHANIZMI PREHODA SNOVI SKOZI CELIČNO MEMBRANO .....	18
1.4.1 Enostavna difuzija.....	18
1.4.2 Olajšana difuzija .....	20
1.4.3 Osmoza in osmotski tlak .....	21
1.4.4 Aktivni transport.....	26
1.5 FIZIOLOŠKE RAZTOPINE .....	27
1.6 DOLOČANJE DELEŽA VODE V TKIVIH.....	29
1.7 TELESNE MERE DOMAČIH ŽIVALI IN BIOMETRIJA .....	30
1.7.1 Telesna masa.....	30
1.7.2 Telesna dolžina in višina.....	30
1.7.3 Telesna površina .....	31
2 FIZIOLOGIJA ŽIVCEV IN ČUTIL.....	33
2.1 NEVRONI IN ŽIVČNI IMPULZ.....	33
2.1.1 Nastanek živčnega impulza.....	33
2.1.2 Inhibicija živčnega impulza .....	36
2.1.3 Hitrost prenosa impulza po živcu.....	37
2.1.4 Refleksi.....	39
2.2 FIZIOLOGIJA ČUTIL.....	41
2.2.1 Čutilo za vid.....	41
2.2.2 Čutilo za sluh .....	45
2.2.3 Čutilo za dotik in bolečino .....	46
2.2.4 Čutilo za okus .....	47
2.2.5 Čutilo za vonj.....	48
3 FIZIOLOGIJA HORMONALNEGA SISTEMA .....	49
3.1 METODE DELE V ENDOKRINOLOGIJI .....	49
3.1.1 Metode proučevanja hormonalnega sistema .....	49
3.1.2 Določanje koncentracij hormonov .....	50
3.2 PRIKAZ DELOVANJA HORMONOV .....	58

3.2.1	Delovanje estrogenov na maternico podgane.....	58
3.2.2	Inzulin in diabetes .....	60
4	FIZIOLOGIJA PREBAVE .....	64
4.1	PREBAVA V USTIHI .....	64
4.1.1	Metode zbiranja sline in proučevanja funkcij slinskih žlez .....	64
4.1.2	Stimulacija izločanja sline pri kuncu .....	66
4.1.3	Vloga amilaze pri prebavi škroba .....	66
4.1.4	Dokaz beljakovin v slini .....	71
4.1.5	Dokaz tiocianatov v slini .....	71
4.2	PREBAVA V ŽELODCU MONOGASTRIČNIH ŽIVALI .....	72
4.2.1	Metode zbiranja želodčne vsebine in želodčnega soka ter proučevanje želodčne sekrecije .....	72
4.2.2	Slojevito nalaganje hrane v želodcu.....	73
4.2.3	Prikaz praznjenja želodca pri podganah.....	74
4.2.4	Kemični procesi prebave v želodcu .....	75
4.3	PREBAVA V PREDŽELODCIH IN SIRIŠČNIKU PREŽVEKOVALCEV .....	79
4.3.1	Odvzem vampove vsebine in proučevanje prebavnih procesov v vampu.....	79
4.3.2	Opazovanje predželodcev telet .....	80
4.3.3	Opazovanje vsebine vampa, prebiralnika in siriščnika .....	80
4.3.4	Poslušanje vampovih kontrakcij.....	81
4.3.5	Kemični procesi prebave v predželodcih in siriščniku prežvekovalcev .....	81
4.3.6	Nastajanje plinov v vampu.....	85
4.3.7	Opazovanje vampovih bakterij in protozojev .....	86
4.4	PREBAVA V ČREVESU.....	89
4.4.1	Metode zbiranja in proučevanja izločanja črevesnega in pankreasnega soka ter žolča .....	89
4.4.2	Emulgiranje maščob pod vplivom žolča .....	91
4.4.3	Reakcija na žolčna barvila (po Gmelinu).....	91
4.4.4	Reakcija na žolčne kisline (po Pettenhoferju).....	92
4.4.5	Vloga lipaze in žolča pri prebavi maščob .....	92
4.4.6	Opazovanje črevesnih resic.....	94
4.4.7	Opazovanje gibanja izoliranega ileuma budre .....	94
5	ENERGETSKI METABOLIZEM IN TERMOREGULACIJA .....	96
5.1	MERJENJE ENERGETSKE VREDNOSTI HRANILNIH SNOVI.....	96
5.2	KALORIMetriJA ŽIVIH ORGANIZMOV .....	98
5.2.1	Direktna kalorimetrija .....	98
5.2.2	Indirektna kalorimetrija .....	100
5.2.3	Merjenje bazalnega metabolizma.....	104
5.2.4	Kalorimetrija pri prežvekovalcih .....	104
5.3	VPLIVI HORMONOV NA METABOLIZEM .....	105
5.3.1	Učinek ščitničnih hormonov na metabolizem .....	105
	LITERATURA .....	109

# 1 SPLOŠNA FIZIOLOGIJA

## 1.1 UPORABA MERSKIH ENOT IN VELIČIN V FIZIOLOGIJI

Težnje po uvedbi enotnih merskih sistemov so obstajale skozi vso človeško zgodovino, poenotenje pa je deloma uspelo šele v Napoleonovem času, leta 1799. Takrat uvedeni merski sistem je postal osnova **Mednarodnega sistema merskih enot** (*Systeme International – SI*), ki ga danes uporablja več kot 150 držav. Njegovo uvedbo v Republiki Sloveniji je opredelil zakon o meroslovju iz leta 2005.

Mednarodni merski sistem sestavljajo osnovne in izpeljane merske enote. **Osnovne merske enote** so enote osnovnih fizikalnih količin (dolžina, čas, masa, električni tok, temperatura, svetilnost in količina snovi), **izpeljane merske enote** pa so iz osnovnih izpeljane na temeljih fizikalnih zakonov oziroma definicij. Ker so enote SI včasih prevelike ali premajhne za dano količino, lahko osnovnim enotam dodamo različne desetiške predpone. Take enote se imenujejo **decimalne merske enote**. V praksi je dovoljena tudi uporaba nekaterih drugih enot izven SI.

Zaradi uvedbe Mednarodnega sistema merskih enot se je spremenilo oziroma zamenjalo mnogo enot in veličin, ki so se v biomedicini uporabljale v preteklosti. Nastali so tudi nekateri dogovori in dopolnila strokovnih združenj z biomedicinskih področij, ki temeljijo na enotah SI. Kljub temu v literaturi (zlasti anglo-ameriški) s področja fiziologije in drugih biomedicinskih ved še vedno zasledimo uporabo tako starih kot tudi enot SI. V nadaljevanju podajamo pregled najpogostejših enot in veličin, ki se uporabljajo v biomedicini, ter pretvorb med enotami SI in starimi enotami.

### 1.1.1 Koncentracija snovi

Po določilih mednarodnega merskega sistema izražamo koncentracijo snovi kot koncentracijo mase ali masno koncentracijo (mkc ali massc) in kot koncentracijo snovi ali snovno koncentracijo (snkc ali substc). Po teh določilih je opuščeno izražanje koncentracij v utežno-volumskih odstotkih (g%, g/100 ml, g/dl, µg%, mg% itd.) ali v ekvivalentih (Eq/l, val/l, mEq/l, mval/l).

- Izraz **snovna koncentracija** uporabljamo za izražanje vseh snovi z znano kemično zgradbo in molekulsko maso, ki so raztopljene v telesnih tekočinah (npr. krvi, plazmi, serumu, urinu, različnih izločkih itd.). S snovno koncentracijo izražamo koncentracijo mikro- in makroelementov, ogljikovih hidratov, aminokislin, kreatinina in kreatina, uree itd. Če bi upoštevali načela SI, bi morali koncentracijo snovi izražati v molih na kubični meter ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ), ti pa so za uporabo v biomedicini prevelike enote. Zato je dopuščeno izražanje v molih na liter (**mol/L**). Namesto izražanja z decimalnimi števili uporabljamo desetiške predpone, npr. milimol (**mmol**), mikromol (**µmol**), nanomol (**nmol**) itd. Pretvorbe v enote SI izvedemo po formulah:

$$\text{mol/L} = \text{g}/100 \text{ ml} \times \frac{10}{\text{mol. masa}} \quad \text{oziroma:} \quad \text{g}/100 \text{ ml} = \text{mol/L} \times \frac{\text{mol. masa}}{10}$$

<b>Tabela 1.1:</b> Konverzijski faktorji za pretvorbe med starimi in novimi enotami za izražanje koncentracij snovi				
<b>Snov</b>	<b>Enota SI</b>	<b>Pretvornik iz enote SI v staro enoto</b>	<b>Stara enota</b>	<b>Pretvornik iz stare enote v enoto SI</b>
<b>MAKROELEMENTI</b>				
kalcij	mmol/L	4,01	mg/100 ml	0,25
magnezij	mmol/L	2,43	mg/100 ml	0,41
natrij	mmol/L	2,299	mg/100 ml	0,43
kalij	mmol/L	3,91	mg/100 ml	0,26
fosfati (v krvi)	mmol/L	3,10	mg/100 ml	0,32
kloridi	mmol/L	3,545	mg/100 ml	0,282
<b>MIKROELEMENTI</b>				
železo	μmol/L	5,585	μg/100 ml	0,179
baker	μmol/L	6,355	μg/100 ml	0,157
cink	μmol/L	6,538	μg/100 ml	0,153
mangan	μmol/L	5,494	μg/100 ml	0,182
kobalt	μmol/L	5,893	μg/100 ml	0,170
nikelj	μmol/L	5,870	μg/100 ml	0,170
svinec	μmol/L	20,719	μg/100 ml	0,048
živo srebro	μmol/L	20,039	μg/100 ml	0,050
fluor	μmol/L	1,901	μg/100 ml	0,526
jod	μmol/L	12,690	μg/100 ml	0,0788
brom	μmol/L	8,000	μg/100 ml	0,125
silicij	μmol/L	2,890	μg/100 ml	0,346
selen	μmol/L	7,874	μg/100 ml	0,127
<b>ORGANSKE SNOVI</b>				
glukoza	mmol/L	18,02	mg/100 ml	0,0555
sečnina	mmol/L	6,006	mg/100 ml	0,1665
sečna kislina	mmol/L	16,81	mg/100 ml	0,0595
kreatinin	mmol/L	0,011	mg/100 ml	88,44
aceton	μmol/L	5,814	μg/100 ml	0,172
hemoglobin	mmol/L	1,61	g/100 ml	0,62
<b>HORMONI</b>				
progesteron	nmol/L	0,3145	ng/ml	3,1796
estradiol	nmol/L	272,03	pg/ml	0,003676
testosteron	nmol/L	0,288	ng/ml	3,472
tiroksin	nmol/L	0,078	μg/100 ml	12,87
trijodtironin (T3)	nmol/L	64,93	ng/100 ml	0,0154
reverzni T3 (rT3)	nmol/L	0,651	ng/ml	1,536
kortizol	nmol/L	0,036	μg/100 ml	27,59
aldosteron	nmol/L	359,71	pg/ml	0,00278

- Izraz **masna koncentracija** uporabljamo za izražanje koncentracije snovi, katerih molekulska masa ni znana ali pa je ne moremo definirati, npr. beljakovin in maščob v telesnih tekočinah. Izraža se v gramih na liter tekočine (**g/L**).

Za številne elemente in spojine, ki sestavljajo organizme, so izračunani pretvorniki (konverzijski faktorji), ki se pri praktičnem delu v laboratoriju uporabljajo namesto vsakokratnega računanja. Pretvorniki za najpogostejše makroelemente, mikroelemente, organske snovi in hormone, ki se nahajajo v organizmu živali, so prikazani v tabeli 1.1.

### 1.1.2 Katalitična aktivnost encimov

V preteklosti so različni avtorji izražali katalitično aktivnost encimov poljubno, zaradi česar so bili podatki med seboj težko primerljivi. Leta 1964 je Komisija za encime pri IUB (*International Union of Biochemistry*) sprejela mednarodno enoto za vrednotenje katalitične aktivnosti encimov z oznako **U (Unit)**. Ta je definirana kot tista katalitična aktivnost encima, ki omogoča pretvorbo 1  $\mu$ mola substrata v 1 minuti. Leta 1972 je Komisija za biokemično nomenklaturu (*Commission of Biochemical Nomenclature*) v skladu z SI predlagala uvedbo enote **katal (kat)**. To je tista katalitična aktivnost encima, ki omogoča pretvorbo 1 mola substrata v 1 sekundi. Pretvorniki za katalitično aktivnost encimov so podani v tabeli 1.2.

**Tabela 1.2:** Pretvorbe katalitične aktivnosti encimov in nekaterih fizikalnih količin, ki se uporabljajo v fiziologiji

Količina	Enota SI	Pretvornik iz enote SI v staro enoto	Stara enota	Pretvornik iz stare enote v enoto SI
katalitična aktivnost encimov	nkat	0,0599	U	16,67
osmolarnost in znižanje zmrzišča	mK	0,538	mOsm/kg	1,86
tlak	kPa	7,501	mm Hg (tor)	0,1333
	kPa	0,00986	atm (fiz.)	101,325
	kPa	0,01	bar	100
sil	N	$10^5$	dyn	$10^{-5}$
moč	kW	1,361	KM	0,735
delo	J	0,1	kpm	9,81
	J	$10^7$	erg	$10^{-7}$
količina toplote	J	0,239	cal	4,1863
hitrost	m/s	3,6010	km/h	0,2777
dolžina	nm	10	Å	0,1

### 1.1.3 Fizikalne enote, ki se uporabljajo v fiziologiji

- **Osmolarnost in osmolalnost** se uporabljata za izražanje koncentracije snovi v zvezi z osmotskim tlakom. Čeprav izven SI, se včasih uporablja enota osmol, ki je enaka 1 grammolu (**gmol**) snovi, ki ne difundira in ne ionizira. O osmolarnosti govorimo, kadar izražamo število osmolov na liter, o osmolalnosti pa pri vrednostih osmolov na kg raztopine. Po SI se uporablja pojem točke znižanja zmrzišča z enoto **milikelvin (mK)**. Pretvorniki so podani v tabeli 1.2.

- V fiziologiji srečamo različne vrste **tlakov**, kot so krvni, mehanični, zračni, vodni, parcialni, osmotski itd. Po SI izražamo vrednosti za tlak v **paskalih (Pa)**. Ker je paskal sorazmerno majhna enota, za vrednosti, ki jih srečujemo v fiziologiji, pogosto uporabljamo enoto **kilopaskal (kPa)**. Izven SI je dovoljena uporaba enote bar. Pretvorbo med drugimi (praviloma opuščeni) enotami, kot so mm Hg, cm H<sub>2</sub>O, atmosfera itd., opravimo s pomočjo pretvornikov, podanih v tabeli 1.2. Pri izražanju vrednosti krvnega tlaka nekateri avtorji še vedno uporabljajo mm Hg. Za hitrejše pretvarjanje iz enote mm Hg v kPa in obratno lahko uporabljamo tabelo 1.3.

**Tabela 1.3:** Pretvarjanje mm Hg v kPa in obratno

mm Hg	kPa	mm Hg	kPa	mm Hg	kPa
5	0,7	105	14,0	205	27,3
10	1,3	110	14,7	210	28,0
15	2,0	115	15,3	215	28,7
20	2,7	120	16,0	220	29,3
25	3,3	125	16,7	225	30,0
30	4,0	130	17,3	230	30,7
35	4,7	135	18,0	235	31,3
40	5,3	140	18,7	240	32,0
45	6,0	145	19,3	245	32,7
50	6,7	150	20,0	250	33,3
55	7,3	155	20,7	255	34,0
60	8,0	160	21,3	260	34,7
65	8,7	165	22,0	265	35,3
70	9,3	170	22,7	270	36,0
75	10,0	175	23,3	275	36,7
80	10,7	180	24,0	280	37,3
85	11,3	185	24,7	285	38,0
90	12,0	190	25,3	290	38,7
95	12,7	195	26,0	295	39,3
100	13,3	200	26,7	300	40,0

- Pri krčenju mišic, delovanju srca in fizičnem delu se v fiziologiji srečujemo s pojmi, kot so **sila**, **moč** in **delo**. Po SI je enota za silo **newton (N)**, za moč **watt (W)** in za delo **joule (J)**. Pretvorniki so podani v tabeli 1.2.
- **Količino toplote**, npr. energetska vrednost hranilnih snovi in količino energije, ki jo žival porablja ali sprošča pri fizioloških procesih, izražamo v **joulih (J)** namesto do nedavnega splošno uveljavljenih kalorij. Nekateri avtorji modernih fizioloških učbenikov menijo, da je izražanje v kalorijah primernejše kot izražanje v joulih. Pretvorbo izvedemo s pomočjo pretvornikov, podanih v tabeli 1.2.
- V fiziologiji obstajajo različni pojavi **hitrosti**, npr. pretoka krvi, širjenja pulznega vala, prenašanja impulzov po tkivu, gibanja itd. Po SI naj bi za izražanje hitrosti uporabljali enoto **meter na sekundo (m/s)**, vendar je še vedno v veljavi uporaba enote **kilometer na uro (km/h)**.



Pretvorbe so prikazane v tabeli 1.2.

- Za izražanje **dolžine** uporabljamo kot osnovno enoto **meter** in njegove izpeljanke, kot so mm, cm, dm in km. Namesto enote mikron ( $\mu$ ) po SI uporabljamo enoto  $\mu\text{m}$ , ki je po velikosti enaka mikronu ( $10^{-6}$  m). Namesto enote angstrom ( $\text{\AA} = 10^{-10}$  m) uporabljamo nanometer ( $10^{-9}$  m). Pretvorba je prikazana v tabeli 1.2.
- **Masa** je osnovna veličina snovi, **teža** pa je sila, ki deluje na dano maso v specifičnem gravitacijskem polju. V Zemljinem gravitacijskem polju je masa izražena v **kilogramih (kg)** (ali ustreznih manjših oz. večjih enotah), teža pa v **newtonih (N)**. V različnih gravitacijskih poljih ostane masa nespremenjena, teža pa je različna. Tako bi npr. telo z maso 35 kg (na Zemlji in na Mesecu enako) imelo na Zemlji težo 350 N, na Mesecu le približno 60 N, v breztežnostnem stanju (npr. v vesolju ali pri prostem padu) pa nič N. Za izražanje molekulske mase uporabljamo izraz **dalton (D)**, ki je sicer izven SI. To je masa 1 atoma vodika, ki znaša  $1,67 \times 10^{-27}$  kg.
- Absolutno **temperaturo** merimo v **stopinjah Kelvina (K)**. Enota K je enako velika kot  $^{\circ}\text{C}$ , le da je izhodišče Kelvinove lestvice pri  $-273$   $^{\circ}\text{C}$  (absolutna ničla). Absolutno temperaturo izračunamo tako, da k  $^{\circ}\text{C}$  prištejemo 273 stopinj.

V angloameriški literaturi navajajo temperature v Fahrenheitovih stopinjah ( $^{\circ}\text{F}$ ). Vrelišče vode je pri 212  $^{\circ}\text{F}$ , zmrzišče pa pri 32  $^{\circ}\text{F}$ . Pretvorbe med  $^{\circ}\text{C}$  in  $^{\circ}\text{F}$  izvedemo po naslednjih formulah:

$$T [^{\circ}\text{F}] = 9/5 \times T [^{\circ}\text{C}] + 32 \quad \text{ozioroma: } T [^{\circ}\text{C}] = 5/9 \times (T [^{\circ}\text{F}] - 32)$$

### Naloge:

S pomočjo konverzijskih faktorjev izračunajte naslednje naloge:

1. Koncentracija ionov natrija v serumu ovce znaša 40 mg%. Izrazite vrednost v ustreznih enotah SI!
2. V serumu goveda je koncentracija kalija 17 mg/100 ml. Kakšna je vrednost v mmol/L?
3. V krvi prašiča se nahaja magnezij v koncentraciji 3,5 mg%. Izrazite vrednost v enotah SI!
4. V pasji krvi je koncentracija kalcija 6 mg/dl. Izrazite vrednost v enotah SI!
5. Ugotovljena vrednost bakra v serumu prašiča je 220  $\mu\text{g}/100$  ml. Kakšna je vrednost v enotah SI?
6. V kunčjih eritrocitih je ugotovljena koncentracija cinka 0,7 mg%. Izrazite vrednost v enotah SI!
7. Fiziološka vrednost koncentracije acetona v goveji krvi znaša 1,2 mg/100 ml. Kakšna je vrednost, izražena v enotah SI?
8. Koncentracija glukoze v konjski krvi znaša 55–95 mg v 100 ml. Koliko znaša vrednost v enotah SI?
9. V krvi podgane je ugotovljena vrednost 15 g hemoglobina v 100 ml krvi. Izrazite vrednost v enotah SI!
10. V serumu kunca je koncentracija proteinov 7,2 g v 100 ml. Izrazite vrednost v enotah SI!
11. Krvni tlak pri psu znaša 120 mm Hg/80 mm Hg. Izrazite vrednost v enotah SI!
12. Konj galopira s hitrostjo 60 km/h. Pretvorite v m/s!
13. Aktivnost encima glutation peroksidaze pri ovcah je 25 U. Izrazite jo v enotah SI!

## 1.2 APARATI IN POSTOPKI V FIZIOLOGIJI

### 1.2.1 Osnovne registracije v fiziologiji

Poleg kvantitativnega merjenja parametrov z različnimi kemičnimi, fizikalnimi ali biološkimi postopki pri eksperimentalnem delu v fiziologiji uporabljamo tudi zapisovanje ali registracijo sprememb. Registracijske naprave neposredno ali posredno zapisujejo gibanje izoliranih organov, delov telesa, celotnega organizma ali drugih reakcij in s tem grafično ponazarjajo dinamične spremembe med poskusom. Z ustreznimi postopki (npr. umeritvenimi krivuljami) je mogoče kvalitativne spremembe tudi kvantitativno ovrednotiti.

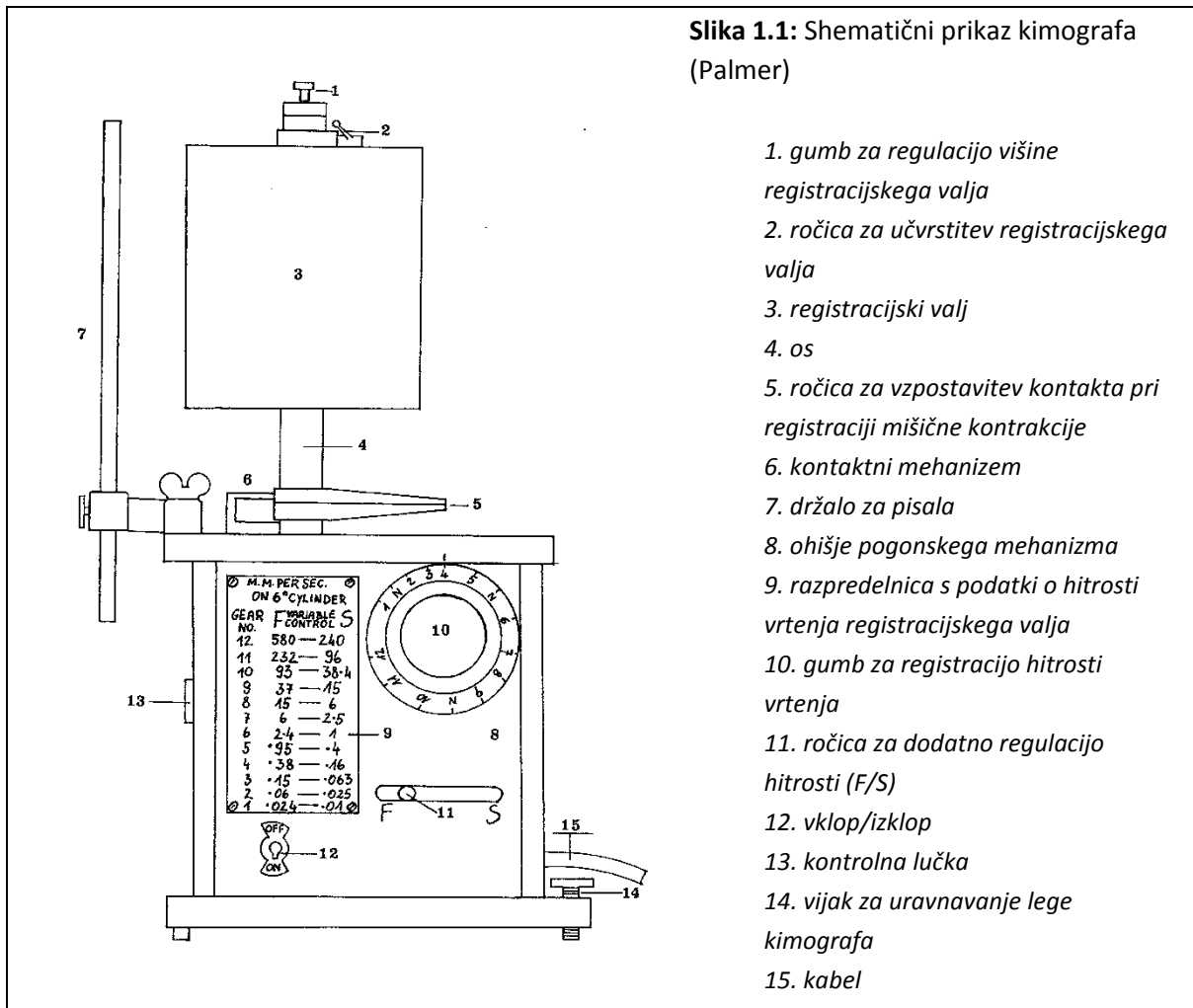
#### **A) Kimograf**

Kimograf je aparat, ki se v fiziologiji največkrat uporablja pri zapisovanju (registraciji) delovanja izoliranih organov. Izolirani organi, ki so na različne načine nameščeni na kimograf, pri spontanem ali vzdraženem delovanju spreminjajo svojo obliko ali dolžino in pri tem premikajo mehanična pisala. Ta premike zapisujejo na vrtečem se valju.

Prvi aparat te vrste je sestavil nemški fiziolog Karl Ludwig leta 1864. Ta kimograf je imel vgrajen urni mehanizem, ki je vrtel registracijski valj. Kasneje je urni mehanizem nadomestil elektromotor, osnovni princip delovanja kimografa pa je do danes ostal nespremenjen. Kljub uvajanju raznih sodobnejših načinov registriranja je kimograf ostal nepogrešljiv sestavni del vsakega fiziološkega laboratorija.

Kimograf sestavljajo: pogonski mehanizem, registracijski valj (boben) in pisala (slika 1.1).

- **Pogonski mehanizem** sodobnih kimografov je elektromotor s sistemom prenosnikov in sklopk, po katerih se vrtenje elektromotorja prenaša na navpično os. Pogonski mehanizem je vgrajen v ohišje, na katerem so nameščeni gumbi in stikala za vklop aparata in regulacijo hitrosti vrtenja valja.
- **Registracijski valj** je nameščen na navpično os, ki izhaja iz ohišja. Njegovo višino lahko uravnavamo. Izdelan je iz kovine, nanj pa je napet papir, na katerega se zapisuje opazovani fiziološki pojav. Glede na vrsto pisala, ki ga uporabljamo pri zapisovanju, lahko uporabimo milimetrski papir ali poseben gladek bel papir, prevlečen s tanko plastjo saj. Hitrost vrtenja valja lahko uravnavamo. Pri zapisovanju gibanj, ki potekajo zelo počasi in trajajo dolgo časa, izberemo nižjo hitrost, pri hitrejših pa višjo.
- Na ohišju kimografa so nameščene **ročice**, kamor z vijaki pritrdimo pisala in prečke za namestitev izoliranih organov. Te namestimo na kimograf tako, da pri krčenju dvigajo pisalo, ki drsi po valju in zapisuje premike. Namestitev posameznih organov je opisana pri vajah z izoliranimi organi.
- Za zapisovanje krivulje na kimografskem bobnu lahko uporabimo posebna **pisala**, napolnjena s črnilom, ki pišejo na milimetrski papir. Lahko uporabimo tudi pisala iz kovine, lahke plastike ali lesa, ki drsijo po osajenem valju in pri tem odstranjujejo saje, za njimi pa ostaja bela sled papirne podlage. Ta pisala so različnih oblik in izvedb glede na vrsto organa, s katerim delamo poskus. Najpogosteje uporabljamo švedsko pero, nihhalno pisalo ali Mareyev boben.



## **B) Fiziograf (poligraf)**

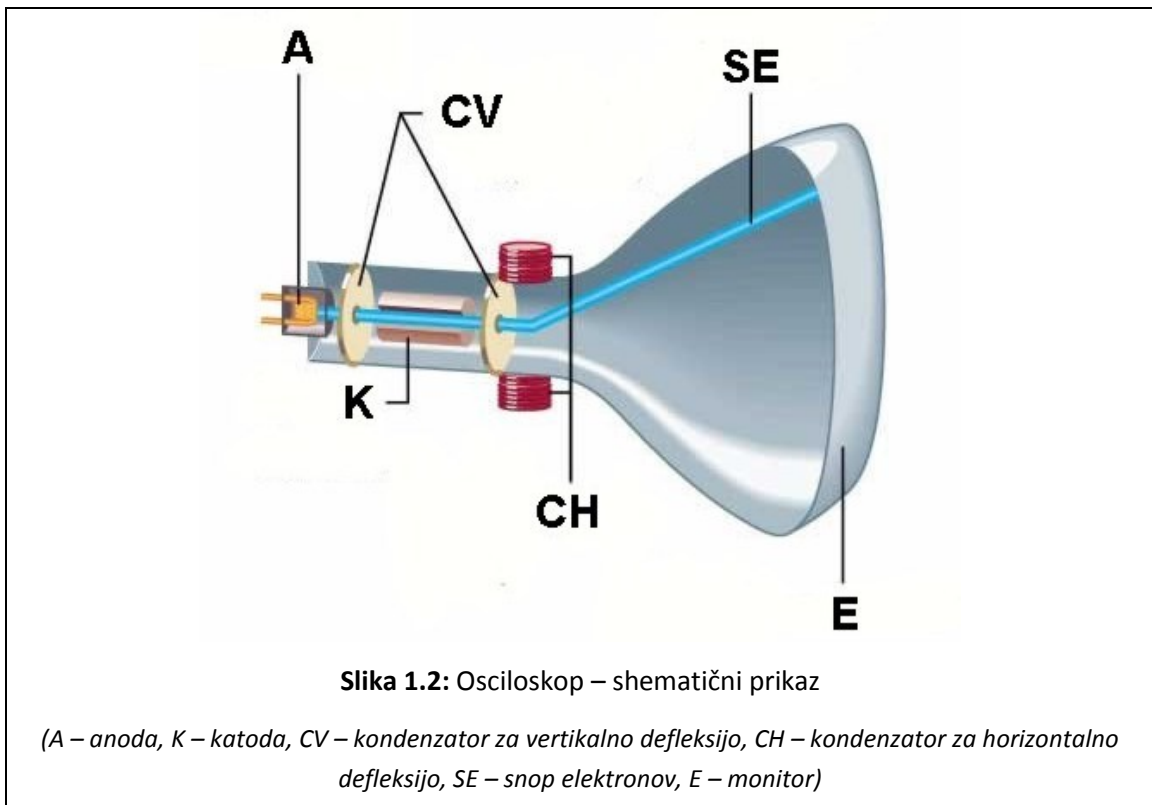
To je naprava, ki omogoča registracijo različnih fizioloških procesov z večjo natančnostjo kot kimograf. Z njim lahko registriramo spremembe, ki si sledijo s frekvenco do 100 Hz. Omogoča nam tudi takojšen zapis pojava. Osnovna enota poligrafa je **kanal**, ki ga sestavljajo pretvornik, ojačevalec in predvajalec.

- **Pretvornik (transducer)** je del, ki fizične pojave pretvarja v električne signale ali v radijske valove. Glede na vrsto meritve poznamo različne oblike pretvornikov. Ob merjenju sile se distorzija ročice prenaša na prevodnike, ki spreminjajo svoj upor. Za merjenje tlakov v kardiovaskularnem sistemu uporabljamo stolpec tekočine v cevi, katere en konec je toga membrana, povezana z uporom. Za nižje tlake so primerni pretvorniki, ki delujejo na fotoelektričnem principu. Uporabljajo se tudi za merjenje manjših premikov, npr. pri proučevanju srca žabe. Za merjenje večjih premikov, npr. v spirometriji, se uporablja linearni ali rotacijski potenciometer. Najenostavnejša naprava za merjenje sprememb temperature pa je t. i. termistor, ki spreminja svojo upornost s spreminjanjem temperature okolice.
- **Ojačevalec (amplifikator)** je del, ki sprejema signale pretvornika in jih spreminja v obliko, primerno za zapis, s tem da jih poveča/ojača, zmanjša.
- **Predvajalec (reproduktor)** pa pretvarja električne signale v obliko, ki jo lahko vidimo, npr. kot odklon kazalca na skali ali zapis krivulje s posebnim pisalom.

Fiziograf ima navadno več kanalov, tako da z njim hkrati lahko registriramo več fizioloških pojavov. Uporabljamo ga za zapisovanje električne aktivnosti srca (zapis - elektrokardiograma (EKG)), električne aktivnosti možganov (zapis - elektroencefalogramov (EEG)), električne aktivnosti mišic (zapis - elektromiogramov (EMG)), krvnega tlaka, delovanja srca, dihanja, srčnih in mišičnih kontrakcij, za merjenje kožnih potencialov itd.

### C) Osciloskop

To je aparat, ki omogoča opazovanje električnih sprememb (potencialov) pri delovanju organov in odgovarja nanje tako hitro, da pri njegovi uporabi v fiziologiji skoraj ni omejitev. S to napravo lahko zaznavamo spremembe s frekvenco do 10 kHz ali več, njena občutljivost pa je zadostna za zaznavanje odklonov nekaj  $\mu\text{V}$ . Če se uporablja s fotopomnoževalkami, lahko zapiše tudi aktivnost ene same celice. Vse te lastnosti omogočajo široko uporabnost osciloskopov v sodobni fiziologiji. Z njimi npr. lahko raziskujemo, analiziramo in prikažemo večino bioelektričnih pojavov v organizmu, kot so akcijski potencial, reakcijski čas, refleksi, hitrost prenosa dražljajev itd.



Glavni del osciloskopa je **katodna cev** (slika 1.2). Vir elektronov (»elektronski top«) pošilja snop elektronov skozi kondenzatorje, na katerih pride do uklona, do ekrana. Kondenzator za horizontalni odmik (defleksijo) je povezan s časovno bazo, ki premika snop elektronov v vodoravni smeri v ustreznih časovnih intervalih. Kondenzator za vertikalni odmik (defleksijo) pa je povezan z ojačevalcem, ki ojača signale, prihajajoče iz organizma. S skladnim delovanjem časovne baze in ojačevalca je omogočeno premikanje snopa elektronov in opazovanje pojavov, ki se dogajajo v organizmu, na monitorju. Ekran osciloskopa je plošča, ki oddaja vidno svetlobo, kadar jo zadene snop elektronov. Zaradi uporabe različnih fluorescentnih materialov sta barva nastale svetlobe pa tudi trajanje fluorescence različna glede na potrebe meritev ali opazovanj.

## 1.2.2 Centrifuge in centrifugiranje

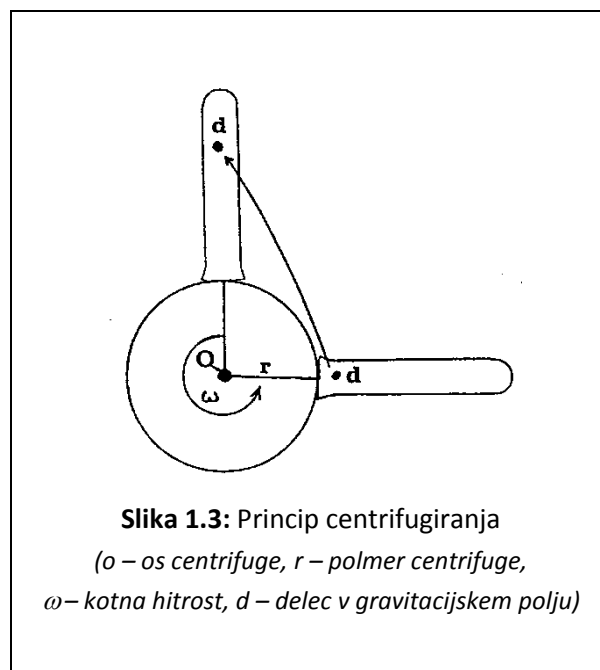
Centrifugiranje je postopek, s katerim ločimo dve ali več snovi z različnimi gostotami, pri čemer je vsaj ena tekočina. Naprave, ki jih pri tem uporabljamo, so centrifuge. Te z vrtenjem ustvarjajo centrifugalni pospešek na trdne delce v gravitacijskem polju, pravokotnem na gravitacijsko os centrifuge (slika 1.3). Pri dani vrednosti gravitacijskega polja centrifuge je ločilnost funkcija razlike v gostoti snovi, ki jih želimo ločiti. Vpliv imata tudi velikost ter oblika delcev in viskoznost raztopine.

Gravitacijsko polje centrifuge oz. njen centrifugalni pospešek ( $g_c$ ) izražamo kot mnogokratnik zemeljskega gravitacijskega pospeška  $g$  ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ) in je premo sorazmeren delovnemu polmeru (*radiusu* –  $r$ ) stroja in kvadratu kotne hitrosti ( $\omega^2$ ), torej je:

$$g_c = r \times \omega^2$$

( $g_c$  – gravitacijski pospešek centrifuge,  $r$  – delovni radius centrifuge,  $\omega^2$  – kvadrat kotne hitrosti)

Iz formule je razvidno, da ima povečanje števila vrtljajev ( $\omega^2$ ) večji vpliv na učinkovitost centrifugiranja kot povečanje polmera.



**Slika 1.3:** Princip centrifugiranja  
( $o$  – os centrifuge,  $r$  – polmer centrifuge,  
 $\omega$  – kotna hitrost,  $d$  – delec v gravitacijskem polju)

Vrednost centrifugiranja je največkrat podana v času (minutah) in v številu obratov v minuti (*Rounds Per Minute* – *RPM*). Zaradi razlik v polmerih centrifug, ki se uporabljajo v praksi, se vrednost centrifugiranja pogosto podaja tudi kot centrifugalni pospešek. Za preračunavanje iz podatka o številu obratov v minuti v centrifugalni pospešek uporabimo formulo:

$$g_c = 11,18 \times \left(\frac{\text{RPM}}{1000}\right)^2 \times r \quad \text{ozioroma:} \quad \text{RPM} = 299,40 \times \sqrt{\frac{g_c}{r}}$$

( $g_c$  – gravitacijski pospešek, *RPM* – število obratov v minuti,  $r$  – delovni radius centrifuge [cm])

Delovni radius centrifuge dobimo tako, da izmerimo razdaljo od sredine osi centrifuge do sredine centrifugirne košarice. Poleg navedenih formul lahko uporabljamo tudi normogram (prikazan je na sliki 1.4). Iz njega lahko razberemo zelene vrednosti. Normogram uporabljamo tako, da povežemo dano vrednost na skali za radius in dano vrednost na skali za število obratov. Na mestu, kjer daljica seka skalo  $g$ , preberemo vrednost centrifugalnega pospeška. Paziti moramo, da na obeh skalah izberemo vrednosti na isti strani.

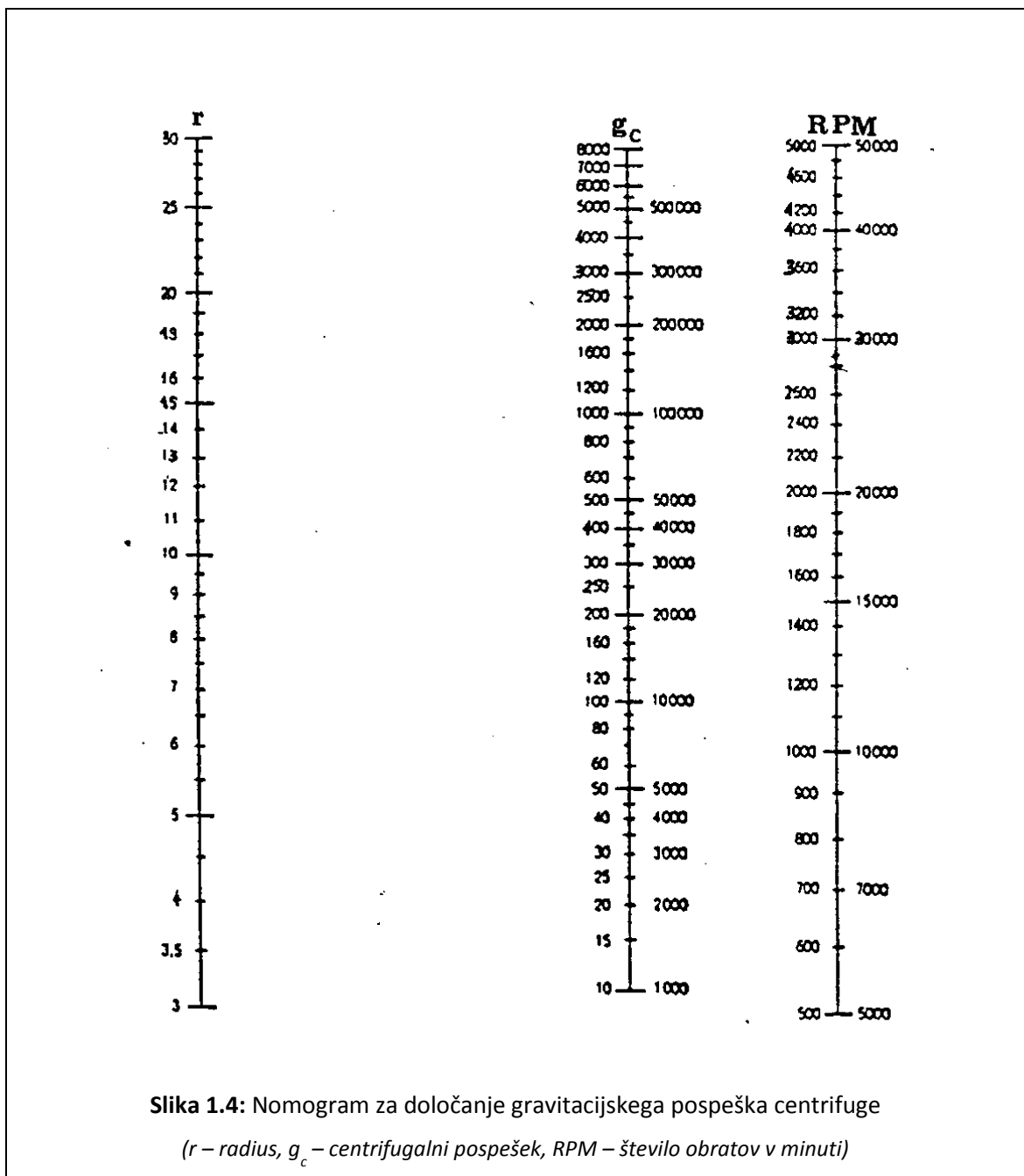
Glede na centrifugalni pospešek ločimo centrifuge z nizkim številom obratov, ki ustvarijo  $g_c$  do 6000  $g$ , centrifuge z velikim številom obratov, ki ustvarijo  $g_c$  do 50.000  $g$ , in ultracentrifuge z  $g_c$  do 500.000  $g$ . Ob velikih centrifugalnih pospeških, ki jih lahko ustvarijo že preproste centrifuge, naj omenimo, da je za uspešen polet vesoljskega plovila iz zemeljskega gravitacijskega polja potrebno "le" od 8 do 10  $g$ .

Sodobne centrifuge so računalniško krmiljene, opremljene pa so tudi s termostati, s katerimi lahko med centrifugiranjem uravnavamo temperaturo znotraj komore centrifuge. Pri centrifugah z velikim številom obratov se zaradi zračnega upora poviša temperatura znotraj komore, zato je pri

njih potrebno nastaviti korekcijo temperature, s katero centrifugo ohlajamo. Ultracentrifuge so opremljene s črpalkami, ki ustvarijo vakuum, da se zmanjša trenje.

Pri delu s centrifugami moramo upoštevati nekaj **osnovnih pravil**. Centrifugo moramo napolniti tako, da so mase v posameznih nasproti stoječih si košaricah med seboj uravnotežene (tarirane). Maso uravnotežimo tako, da postavimo košarici na dvokrako tehtnico in z razporejanjem epruвет, dolivanjem testnih vzorcev ali druge tekočine v nasproti si stoječe epruvete dosežemo, da sta košarici v ravnotežju. Posamezna ležišča epruвет morajo biti diagonalno nasprotno obremenjena.

Večanje števila obratov ob zagonu naj bo v skladu z navodili za posamezno napravo. Največjega dovoljenega števila obratov ne smemo v nobenem primeru preseči. Ker centrifugalna sila narašča s kvadratom števila vrtljajev, lahko pride do porušjenja centrifuge, s tem pa do hudih nesreč.

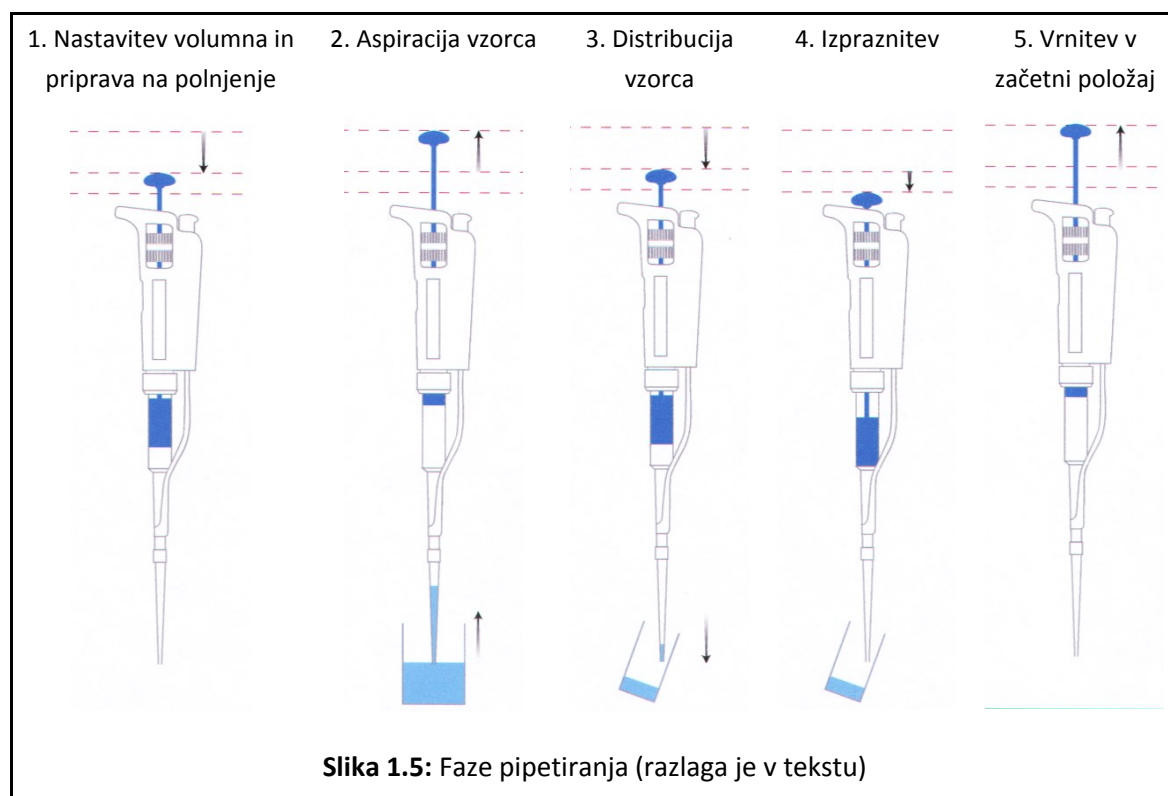


### 1.2.3 Avtomatske pipete in pipetiranje

V fiziološkem laboratoriju se za prenašanje tekočin večinoma uporabljajo avtomatske pipete z nastavljivim volumnom od nekaj  $\mu\text{L}$  do več ml. Večina avtomatskih pipet ima dve stopnji pipetiranja, tako da iz nastavka lahko iztisnemo tudi zadnjo kapljico tekočine.

Postopek pipetiranja je prikazan na sliki 1.5. Pred začetkom pipetiranja na pipeto namestimo ustrezen nastavek in izberemo volumen pipetiranja. Bat potisnemo do prve stopnje [1.] in konico potopimo v tekočino (za 2–6 mm), pri čemer moramo pipeto držati čimbolj navpično. Nato počasi spuščamo bat, da se povrne v začetni položaj [2.], kar omogoči prehajanje tekočine v nastavek. Počakamo eno sekundo, da se nastavek v celoti napolni. Bata ne smemo spustiti prehitro, ker lahko del tekočine prodre v notranjost pipete in jo onesnaži, lahko pa tudi zamaši. Napolnjene pipete ne odlagamo iz rok! Pri praznjenju nastavek pipete prislonimo na steno sprejemne posode pod kotom 10 do  $45^\circ$ , počakamo 1 sek (pri viskoznih tekočinah 2–3 sek), nato počasi potisnemo bat najprej do prve stopnje, da izpraznimo nastavek [3.], nato pa še druge [4.], da iz nastavka odstranimo ostanek tekočine. Nato odstranimo pipeto iz posode in nazadnje spustimo bat v začetni položaj [5.].

Pri **reverznem** pipetiranju bat potisnemo do druge stopnje, vsrkamo celotni volumen tekočine in jo izpraznimo do prve stopnje. Ta tehnika se uporablja za pipetiranje majhnih volumnov, viskoznih tekočin, tekočin, ki se penijo, ali za več zaporednih pipetiranj iste tekočine.



Slika 1.5: Faze pipetiranja (razlaga je v tekstu)

V vseh primerih mora biti pipetiranje natančno in točno, saj le tako lahko zagotovimo dobre rezultate meritev. Na delovanje epruvete namreč vplivajo številni dejavniki, kot so zunanja temperatura, zračni tlak, gostota tekočine in nagib pipete med pipetiranjem. Med pipetiranjem lahko pride tudi do navzkrižne kontaminacije nastavkov, pipete ali vzorcev. Zato moramo nastavke menjavati, držati pipeto navpično in jo odlagati v zanjo namenjeno stojalo, bat pa spuščati zelo počasi. Pravilno delovanje pipete zagotavljamo tudi z rednim čiščenjem in kalibracijo.

## 1.3 POSKUSNE IN LABORATORIJSKE ŽIVALI

**Poskusne živali** so vse vrste živali, na katerih se opravljajo poskusi. Zanje ni nujno, da so gojene v laboratorijskih populacijah. Kot poskusne živali se uporabljajo različne vrste glodavcev (miši, podgane, morski prašički, kunci, hrčki), psi, mačke, ovce, konji, koze, prašiči, opice (*Rhesus*) in različne vrste ptic, plazilcev in dvoživk.

**Laboratorijske živali** so kategorija poskusnih živali, med katere štejemo vrste, namerno izbrane in gojene v laboratorijih. Zanje je značilno, da so majhnih telesnih dimenzij, da se hitro razmnožujejo, da imajo znano genetsko konstitucijo in da so poceni. Glavni predstavniki laboratorijskih živali so miši, podgane, morski prašički in kunci.

**Tabela 1.4:** Biološke lastnosti nekaterih odraslih laboratorijskih živali

Lastnosti	Miš	Podgana	Budra	Kunec
telesna masa odraslih živali [g]	20–40	300–400	700–1500	1000–6000
povprečna življenjska doba [leta]	2–4	2	4–7	1–6
spolna zrelost [tedni]	6–8	6–10	12	20–24
trajanje spolnega ciklusa samic [dnevi]	4–5	4–5	12	inducirana ovulacija
trajanje brejosti [dnevi]	19–21	20–22	59–74	28–34
število mladičev	6–10	6–12	1–6	4–12
starost mladičev ob odstavitvi [dnevi]	8–21	21	14	42–56

### 1.3.1 Splošna načela o ravnanju s poskusnimi živalmi

Pri delu s poskusnimi živalmi se moramo v prvi vrsti zavedati, da imamo pred seboj živa bitja, ki občutijo strah in bolečino, zato moramo ravnati z njimi z občutkom in potrpljenjem in se na vsak način izogibati kakršnemukoli mučenju. Reakcije poskusnih živali so pod vplivom različnih zunanjih in notranjih dejavnikov, ki se jim moramo čimbolj izogibati ali jih držati v konstantnih mejah, da lahko dobimo uporabne rezultate poskusov. Zunanje in notranje dejavnike lahko uravnavamo in nadziramo le s primernim higienskim vzdrževanjem in prehranjevanjem, s preprečevanjem bolezni in z optimalnim okoljem.

V Sloveniji delo s poskusnimi živalmi ureja Zakon o zaščiti živali (UL RS 38/2013). Po določilih tega zakona smejo poskuse na živalih izvajati le organizacije, ki so registrirane za izvajanje poskusov na živalih in imajo dovoljenje upravnega organa, pristojnega za veterinarstvo. Dovoljenje za poskus se izda samo, če je poskus nujen v medicinske, veterinarskomedicinske ali nasploh v znanstvenoraziskovalne namene in se pričakuje, da bodo rezultati prinesli pomembna nova spoznanja, če gre za temeljne raziskave in če se ciljev poskusa ne da doseči z drugimi metodami in postopki. Osebe za vodenje in izvajanje poskusa ter nego in oskrbo živali, prostori za bivanje oziroma gojitev in oskrbovanje živali ter naprave in priprave morajo izpolnjevati predpisane pogoje, živali pa morajo izvirati iz registrirane in organizirane reje poskusnih živali. Dovoljenja se ne sme izdati za poskuse z etično nesprejemljivimi cilji, npr. preizkušanje bojnih sredstev, kozmetičnih preparatov, tobačnih ali alkoholnih izdelkov.



**V izobraževalne namene** so posegi, ki povzročajo živalim trpljenje, poškodbe ali smrt, prepovedani. Izjemoma lahko upravni organ, pristojen za veterinarstvo, dovoli take posege, če se izvajajo v visokošolskih ali znanstvenoraziskovalnih organizacijah in so nujno potrebni za izobraževanje veterinarjev, zdravnikov, biologov, farmacevtov in zootehnikov, če njihovega cilja ni mogoče doseči z drugimi učnimi pripomočki (filmi, slike, modeli, preparati).

### 1.3.2 Področja uporabe in razdelitev poskusnih živali

Laboratorijske živali najpogosteje uporabljamo na naslednjih **področjih**:

- **v diagnostiki** različnih bolezni živali in ljudi ter pri bioloških poskusih v farmakologiji, imunologiji in serologiji; večina bioloških poskusov je standardizirana v farmakopejah;
- **pri znanstvenoraziskovalnem delu**, ki obsega vsa področja raziskovanj, od različnih teoretičnih do vsakodnevnih raziskav strupenosti, farmakokinetičnih in terapevtskih lastnosti različnih kemičnih snovi in zdravil, raziskovanja v onkologiji in radiobiološka raziskovanja;
- **pri izobraževanju**, kjer se poskusne živali uporabljajo za praktični pouk in za različne demonstracije v fiziologiji, farmakologiji, anatomiji in pri drugih bioloških predmetih.

**Po genetski konstituciji** delimo laboratorijske živali v naslednje skupine: linijske živali, hibridi, nelinijske živali in transgene živali.

- **Linijske živali** so genetsko kontrolirane živali, vzgojene s parjenjem v sorodstvu. Pri reji teh živali težijo k doseganju homozigotnosti, vendar so živali zaradi tega zelo občutljive.
- **Hibridi** so prve generacije potomcev linijskih živali, ki se razlikujejo le v določenih genih. Hibridi so vitalnejši od starševskih linij zaradi pojave heterozisa.
- **Nelinijske živali** so heterozigotne in genetsko zelo variabilne, ker pri njih ne prihaja do parjenja v sorodstvu.
- **Transgene živali** so tiste, katerih genotip je namerno spremenjen z vključitvijo tujega (večinoma humanega) gena ali inaktivacije specifičnega gena (tehnika *knock out*). Zato transgene živali pridobijo specifične lastnosti, ki jih lahko prenašajo na potomce. V ta namen se večinoma uporabljajo miši, vse več pa tudi podgane, hrčki, kunci in ovce. Uporabljajo se za proučevanje nekaterih bolezni in proizvodnjo nekaterih beljakovin (npr. mlečna žleza – izločanje inzulina in nekaterih faktorjev koagulacije krvi).

**Glede na prisotnost mikrobov** (apatogenih in patogenih) delimo poskusne živali na naslednje skupine: konvencionalne poskusne živali, SPF živali in gnotobiotične živali.

- **Konvencionalne poskusne živali** gojimo v normalnih pogojih okolja. V svojih organizmih nosijo številne patogene in apatogene klice. Prisotnost patogenih mikrobov normalno ne povzroča bolezni, vsaj dokler imajo živali dovolj obrambnih sposobnosti, preobremenitve (stres) pa lahko povzročijo izbruh bolezni.
- **SPF živali (*specific pathogene free*)** so proste določenih patogenih klic. Te živali tik pred rojstvom spravijo na svet v sterilnih pogojih s carskim rezom. Okužijo jih le z nepatogenimi klicami, ki so nujne za njihovo življenje (npr. črevesna mikroflora). Nato jih gojijo v zaprtem okolju, lahko tudi skozi več generacij.

- **Gnotobiotične živali** so rojene sterilno s carskim rezom in gojene v sterilnih razmerah. Uporabljajo se predvsem za različne bakteriološke in virološke poskuse ter kot izhodiščni material za SPF živali.

## 1.4 MEHANIZMI PREHODA SNOVI SKOZI CELIČNO MEMBRANO

Zaradi svoje molekularne sestave je celična membrana selektivno (diferencialno) prepustna. Zato snovi, ki jih celica potrebuje, lahko vstopajo vanjo, različni ekskreti in odpadne snovi pa izstopajo, nekatere snovi zadržuje znotraj celice, spet drugim pa preprečuje vstopanje. Procesi prehoda snovi skozi celično membrano so lahko pasivni (difuzija, olajšana difuzija in osmoza) ali aktivni (nosilci – črpalke).

### 1.4.1 Enostavna difuzija

Enostavna difuzija je premikanje molekul topljencev s področij njihove večje koncentracije na področja manjše zaradi kinetične energije molekul. Hitrost, s katero molekule prehajajo skozi membrano, je obratno sorazmerna z njihovo molekulsko maso. Izmerimo jo na osnovi časa, ki je potreben, da se koncentracija molekul na obeh straneh membrane izenači. Odvisna je od koncentracijske razlike, površine in konstante prepustnosti membrane.

Nepolarne snovi (npr. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, steroidi, maščobne kisline) difundirajo zelo hitro, ker se topijo v nepolarnih področjih membrane. Polarne snovi imajo slabšo topnost v membranskih fosfolipidih, zato difundirajo slabše ali pa sploh ne. Različni ioni (npr. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) pa prehajajo skozi beljakovinske kanalčke, ki so večinoma selektivno prepustni.

Enostavno difuzijo lahko prikažemo z računalniškim programom **PhysioEx** (poglavje **Mehanizmi celičnega transporta in permeabilnost (Cell Transport Mechanisms and Permeability)**), vaja **Poskus/Enostavna difuzija (Experiment/Simple diffusion)**.

Sistem za merjenje difuzije (slika 1.6) sestavljajo steklena valja, nameščena nad dispenzerjema raztopin, predel z dializnimi membranami na desni in prikaz rezultatov na dnu. Valja sta povezana z nosilcem, na katerega namestimo izbrano dializno membrano. Vsaka membrana ima drugačno velikost por (**Molecular Weight Cutoff – MWCO**); večja kot je ta vrednost, večje so pore. Koncentracije uporabljenih raztopin so prikazane ob straneh valjev. Pod vsakim valjem so navedene raztopine, ki jih lahko uporabimo. Njihove koncentracije izberemo sami. Raztopine prenesemo v valj z ukazom **Pripravi (Dispense)**. Z ukazom **Začni (Start)** se odpre nosilec za dializno membrano, tako da ta pride v stik s tekočinama v valjih. Po vsakem poskusu izberemo ukaz **Izperi (Flush)** za čiščenje valjev.

#### a) Postopek:

1. Izberemo membrano z MWCO 20 in jo premestimo v nosilec med obema valjema. Pod levim valjem izberemo 10 mM raztopino Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, s katero napolnimo levi valj (**Dispense**).
2. Pod desnim valjem izberemo destilirano vodo (**Deionized Water**) in z njo napolnimo desni valj (**Dispense**).
3. Čas nastavimo na 60 min. Z ukazom **Start** umaknemo pregrado med valjema, tako da membrana pride v stik z obema tekočinama. Opazujemo izpis koncentracij ob straneh obeh valjev. Rezultate meritve zapišemo.
4. Po končani meritvi odstranimo membrano in z ukazom **Flush** speremo čaši.

5. Izberemo naslednjo membrano (MCWO 50) in ponovimo stopnje 2 do 4. Z meritvami nadaljujemo, dokler ne testiramo vseh membran. Rezultate meritev zapišemo v tabelo.
6. Serijo meritev ponovimo še z 10 mM raztopinami glukoze, uree in albumina ter zapišemo rezultate.



Slika 1.6: Sistem za prikaz difuzije

Topljenec (koncentracija)	Membrana (MWCO)			
	20	50	100	200
NaCl (10 mM)				
glukoza (10 mM)				
urea (10 mM)				
albumin (10 mM)				

**b) Naloge:**

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo ((+) difuzija je potekala, (-) difuzija ni potekala)!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Katere raztopine so prehajale skozi membrano? Razložite, zakaj!
  - Katere raztopine niso prehajale skozi membrano? Razložite, zakaj!

## 1.4.2. Olajšana difuzija

Skozi celično membrano lahko prehajajo tudi velike, polarne molekule. Njihov prehod omogočajo beljakovinski nosilci, ki spreminjajo konformacijo (strukturo) ob vezavi molekul, ki prehajajo skozi membrano. Eden najpomembnejših sistemov olajšane difuzije v organizmu je prehod glukoze.

Olajšano difuzijo lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx (poglavje **Mehanizmi celičnega transporta in permeabilnost (Cell Transport Mechanisms and Permeability)**, vaja **Poskus/Olajšana difuzija (Experiment/Facilitated diffusion)**). Sistem za merjenje olajšane difuzije je v osnovi podoben kot pri prejšnjem poskusu (slika 1.6), le da sta pri njem na voljo le  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  in glukoza. Na desnem robu virtualnega laboratorija pa je enota za pripravo membrane (**Membrane Builder**), s katero v dializno membrano vgrajujemo beljakovinske nosilce.

### a) Postopek:

1. Na števcu enote za pripravo membrane izberemo 300 transporterjev in jih z ukazom **Build Membrane** vgradimo v membrano.
2. Membrano premestimo v nosilec med obema valjema.
3. Pod levim valjem pripravimo raztopino 3 mM glukoze in 3 mM  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  in valj napolnimo z ukazom **Dispense**.
4. Pod desnim valjem izberemo destilirano vodo (**Deionized Water**) in ga z ukazom **Dispense** napolnimo.
5. Čas nastavimo na 120 min in z ukazom **Start** umaknemo pregrado med valjema.
6. Opazujemo izpis koncentracij ob straneh obeh valjev in zapišemo čas do izenačitve koncentracij na obeh straneh membrane.
7. Po končani meritvi odstranimo membrano in z ukazom **Flush** speremo valja.
8. Postopek od 1. do 7. ponovimo še z membranami, v katere vgradimo 600 in 900 nosilcev; rezultate meritev zapišemo v tabelo.
9. Postopek ponovimo še z raztopino 9 mM glukoze in 9 mM  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  ter zapišemo rezultate.

Koncentracija glukoze (mM)	Membrana (število nosilcev)		
	300	600	900
3			
9			

### b) Naloge:

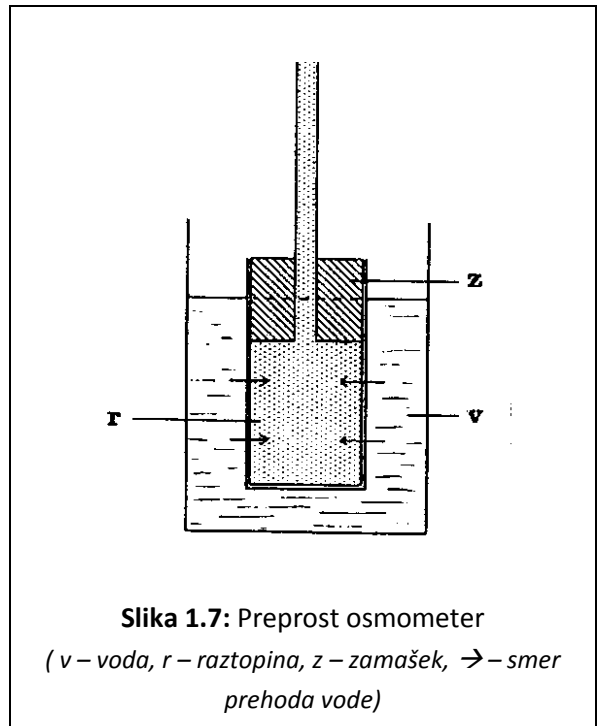
1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Kako se je ob določeni koncentraciji glukoze spreminjal čas prehoda glede na število nosilcev?
  - Kako je ob določenem številu nosilcev na čas prehoda vplivala koncentracija glukoze?

### 1.4.3 Osmoza in osmotski tlak

Osmoza je fizikalni pojav, ki nastane, kadar sta raztopini neke snovi z različnima koncentracijama med seboj ločeni z membrano, ki prepušča samo molekule topila, ne pa molekul topljenca. Izenačenje koncentrij raztopin na obeh straneh membrane se vzpostavi s prehodom topila v smeri raztopine z večjo koncentracijo. Sila, s katero se molekule topila gibljejo, se imenuje osmotski tlak. Če bi v enostavnem osmometru (slika 1.7) preprečili potovanje vode v smeri večje koncentracije, bi za to potrebovali neko silo. S tega stališča bi osmotski tlak lahko definirali kot silo, ki mora delovati na raztopino z večjo koncentracijo, da prepreči prehajanje vode iz raztopine z manjšo koncentracijo skozi polprepustno membrano.

Osmotski tlak je odvisen od števila delcev v raztopini in ne od njihove velikosti ali mase (*koligativne lastnosti*). To pomeni, da bodo elektrolitske raztopine zaradi pojava disociacije imele večji osmotski tlak kot neelektrolitske raztopine enake koncentracije. Zato sta pri neelektrolitih molarna in osmolarna koncentracija identični, pri elektrolitih pa je osmotski tlak odvisen od disociacijske konstante, tj. od števila ionov, na katere molekule elektrolita disociirajo.

Katerakoli vodna raztopina s koncentracijo enega mola ( $6,023 \times 10^{23}$  molekul ali ionov) na liter ima pri 0 °C osmotski tlak 2270 kPa (22,4 atm), ker se razredčene raztopine ravna po Avogadrovem zakonu.



Koncentracijo osmotskih delcev izražamo (čeprav izven SI) z osmolarnostjo. Enota osmolarnosti je osmol (Osm) oziroma miliosmol (mOsm). En osmol je v gramih izražena molarna koncentracija snovi, ki ne disociira na ione ali druge delce, v enem litru raztopine. Z drugimi besedami bi lahko rekli, da je to količina snovi z osmotskim učinkom, enakovrednim 2270 kPa v enem litru raztopine.

V živalskem telesu je osmoza izredno pomemben način prehajanja vode iz izvenceličnega v celični prostor. V telesu je topilo voda, topljenec pa anorganske in organske soli oziroma njihovi ioni. Kadar je osmotski tlak v celicah večji kot v izvenceličnem prostoru, prehaja voda iz ožilja, črevesja, podkožja, telesnih votlin ali drugih področij v medcelični prostor in iz njega v celice. Kadar pa je osmotski tlak v ožilju, telesnih votlinah ali drugih predelih telesa večji kot v celicah, potuje voda iz celic v smeri večjega osmotskega tlaka v te prostore.

**A) Prikaz osmoze in osmotskega tlaka z računalniško simulacijo**

Osmozo lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx (poglavje **Mehanizmi celičnega transporta in permeabilnost (Cell Transport Mechanisms and Permeability)**), vaja **Poskus/Osmoza (Experiment/Osmosis)**). Sistem za merjenje osmoze je podoben kot pri poskusu 1.4.1 (slika 1.6), le da sta v njem nad valjema nameščena merilca tlaka.

**a) Postopek:**

1. Izberemo membrano z velikostjo por (MWCO) 20 in jo premestimo v nosilec med obema valjema.
2. Pod levim valjem pripravimo 10 mM raztopino  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  in ga z ukazom **Dispense** napolnimo.
3. Pod desnim valjem izberemo destilirano vodo (**Deionized Water**), nato pa ga z ukazom **Dispense** napolnimo.
4. Čas nastavimo na 60 min in z ukazom **Start** umaknemo pregrado med valjema in membrano, tako da ta pride v stik s tekočinama, ki ju ločuje.
5. Opazujemo izpis koncentracij ob straneh obeh valjev in spremembe tlaka na prikazu nad levim valjem. V spodnji tabeli zapišemo čas do izenačitve koncentracij ali osmotskega tlaka v valjih.
6. Po končani meritvi odstranimo membrano; z izbiro ukaza **Flush** speremo čaši in ju pripravimo za naslednjo meritve.
7. Izberemo naslednjo membrano (MWCO 50) in ponovimo stopnje 2. do 6. Z meritvami nadaljujemo, dokler ne testiramo vseh membran. Rezultate meritev zapišemo.
8. Serijo meritev ponovimo še z 20 mM raztopino  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  ter z 10 mM in 20 mM raztopino albumina. Rezultate meritev zapišemo.

Topljenec [koncentracija]	Velikost por v membrani [MWCO]			
	20	50	100	200
NaCl [10 mM]				
NaCl [20 mM]				
albumin [10 mM]				
albumin [20 mM]				

**b) Naloge:**

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Razložite razmerje med koncentracijo raztopine in osmotskim tlakom!
  - Ali osmotski tlak nastane, če topjenec difundira skozi membrano? Razložite!

**B) Prikaz osmoze z dializno cevko**

Osmozo lahko v laboratoriju prikažemo z uporabo dializne cevke. To je cevka iz celofana (acetatne celuloze), ki deluje kot polprepustna membrana in makromolekulam ne dovoljuje prehoda. Velikost por (MWCO) različnih tipov dializnih cevk je različna. Glede na potrebe ločevanja uporabimo dializno cevko s tako velikostjo por, ki bo prepuščala le molekule določene velikosti. Dializa skozi celofanske membrane se pri laboratorijskem delu uporablja za razsoljevanje ali zamenjavo pufra, v katerem so raztopljene makromolekule, po principih osmoze. Pred uporabo moramo acetatno celulozo omočiti z destilirano vodo, da aktiviramo pore, ki postanejo prepustne za določene snovi.

**a) Material:**

Destilirana voda, nereazredčen sirup (100 %), 25 %, 50 % in 75 % raztopina sirupa, čaše 250 ml, lesena ali steklena palčka, dializne cevke (dolžina 25 cm), tehničnica, elastike, papirnate brisače.

**b) Postopek:**

1. Dializno cevko aktiviramo z destilirano vodo (jo preperemo). Na enem koncu jo tesno zavežemo z elastiko.
2. Dializno cevko napolnimo z 10 ml 25 %, 50 %, 75 % raztopine sladkornega sirupa ter nerazredčenim sirupom.
3. Drugi konec cevke tesno zavežemo z elastiko.
4. Obrišemo površino cevke in jo stehtamo. Rezultat vnesemo v tabelo (začetna masa).
5. Napolnjeno cevko obesimo na palčko in potopimo v čašo, napolnjeno z destilirano vodo. Cevka mora biti v celoti potopljena.
6. Po 20, 40 in 60 min vzamemo cevko iz čaše, jo obrišemo in stehtamo ( $\pm 0,1$  g). Rezultate tehtanja zapišemo v tabelo.

Čaša	Koncentracija raztopine [%]	Začetna masa [g]	Masa po 20 min [g]	Masa po 40 min [g]	Masa po 60 min [g]
1	25				
2	50				
3	75				
4	100				

**c) Naloge:**

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Grafično prikažite spreminjanje mase cevk z različno koncentracijo raztopine ob posameznih časovnih intervalih (abscisa – čas merjenja, ordinata – masa dializne cevke)!

### **C) Merjenje osmotskega tlaka**

V številnih poskusih v biomedicini je treba vedeti, kakšen je osmotski tlak določene raztopine v primerjavi s tistim v celici. Glede na to ločimo:

- **izotonične raztopine**, katerih osmotski tlak je enak kot v celici,
- **hipertonične raztopine**, katerih osmotski tlak je večji kot v celici, in
- **hipotonične raztopine**, katerih osmotski tlak je manjši kot v celici.

Osmotski tlak lahko merimo **posredno** z ugotavljanjem točke znižanja zmrzišča (**krioskopija**) ali točke zvišanja vrelišča (**ebuloskopija**). Pri 1-molarnih vodnih raztopinah se zniža točka zmrzišča za 1,86 °C (**konstanta ledišča** ( $\delta M$ ) = **-1,86 °C**) in poviša točka vrelišča za 0,52 °C (**konstanta vrelišča**). V biomedicini se v glavnem uporablja krioskopija zaradi možnosti denaturacije beljakovin pri ebuloskopiji.

**Neposredno** presojanje osmotskega tlaka lahko izvedemo z opazovanjem oblike eritrocitov v različnih raztopinah pod mikroskopom ali s pomočjo hematokrita.

- **Merjenje osmotskega tlaka s krioskopijo**

Krioskopija ali postopek določanja točke znižanja zmrzišča je eden od načinov določanja osmolarnosti raztopin.

**Postopek:**

Preiskovano raztopino postavimo v mrzotvorno snov in s termometrom ali ustreznim toplotnim členom merimo njeno temperaturo preiskovane raztopine. Ko se v testni raztopini pojavijo kristalčki ledu, zapišemo temperaturo. Nato raztopino prenehamo ohlajati in ponovno zapišemo temperaturo, ko se kristalčki raztopijo. Iz obeh podatkov izračunamo srednjo vrednost znižanja točke zmrzišča, ki jo upoštevamo pri izračunu osmotskega tlaka po formuli:

$$\frac{\delta t}{\delta M} = \frac{\Pi}{2270 \text{ kPa}}$$

$$\text{zato je } \Pi = \frac{\delta t}{\delta M} \times 2270 \text{ kPa} \quad \text{ali} \quad \Pi = \frac{\delta t}{1,86 \text{ }^\circ\text{C}} \times 2270 \text{ kPa}$$

( $\delta t$  – znižanje zmrzišča testne substance,  $\delta M$  – znižanje zmrzišča 1-molarne vodne raztopine idealnega elektrolita,  $\Pi$  – osmotski tlak testne raztopine, 2270 – osmotski tlak 1-molarne raztopine, 1,86 °C – znižanje zmrzišča 1-molarne vodne raztopine (konstanta ledišča))

- **Opazovanje eritrocitov v izotonični, hipotonični in hipertonični raztopini NaCl**

Glede na različne osmotske tlake okolice, v kateri se nahajajo, eritrociti spreminjajo svojo obliko in prostornino.

- V **izotoničnih** raztopinah (NaCl, glukoza itd.), katerih osmotski tlak ustreza osmotskemu tlaku eritrocitov, eritrociti ne spreminjajo svoje oblike in prostornine.
  - V **hipertoničnih** raztopinah, kjer je osmotski tlak večji kot v celicah, prehaja znotrajcelična voda
-



skozi eritrocitno membrano v okolico. Eritrociti postanejo zaradi izgube vode manjši in različnih nepravilnih (zvezdastih) oblik.

- V **hipotoničnih** raztopinah pa zaradi razlike v osmotskem tlaku vstopa voda iz okolice skozi celično membrano v eritrocit. Celica, ki na ta način sprejme vodo, se povečuje in spreminja svojo obliko ter postaja okrogla. Eritrocitu pravilne oblike in velikosti se v **hipotonični** raztopini premer in površina manjšata, volumen pa povečuje, dokler ne doseže okrogle (sferične) oblike; šele tedaj začne naraščati tudi njegov premer sorazmerno z volumnom. Volumen popolnoma sferičnega eritrocita je za 77 % večji kot v začetku, čeprav je njegov premer manjši. Celična membrana eritrocita je fleksibilna, vendar neelastična, zato celica poči (hemolizira), če vanjo prihaja voda nad kritičnim volumnom. Vsi ostareli eritrociti postanejo sferični, preden propadejo.

**a) Material:**

Citratna kri, fiziološka raztopina za toplokrvne živali, raztopina NaCl snkc 0,515 mol/L (mkc 30 g/L), predmetnice, mikroskop.

**b) Postopek:**

1. V prvo epruveto odpipetiramo 3 ml fiziološke raztopine, v drugo pa enako količino raztopine NaCl.
2. V vsako epruveto dodamo po 0,2 ml krvi in dobro premešamo.
3. Iz vsake epruvete nanesimo kapljico eritrocitne suspenzije na predmetnico in opazujemo celice pod mikroskopom.

**c) Naloge:**

Narišite videz eritrocitov v izotonični in hipertonični raztopini!

- **Spremembe volumna eritrocitov v raztopinah NaCl različnih koncentracij**

Namen vaje je s hematokritsko metodo po Wintrobeju (gl. vajo 6.5) ugotoviti, kako se bo spremenil volumen eritrocitov pod vplivom sprememb v osmotskem tlaku.

**a) Material:**

Eritrociti (predhodno ločeni iz citratne krvi s centrifugiranjem), raztopine NaCl: A – 5 g/L, B – 10 g/L, C – 15 g/L, D – 30 g/L, E – 45 g/L, hematokritske cevke (po Wintrobeju), brizge z dolgimi iglami, pipete in epruvete.

**b) Postopek:**

1. V epruvetah pripravimo suspenzije eritrocitov tako, da posameznim raztopinam NaCl dodamo enake količine eritrocitov (približno 1 ml). Vsebinsko previdno premešamo.
2. S suspenzijami eritrocitov v različnih raztopinah NaCl napolnimo hematokritske cevke in jih centrifugiramo 20 minut na 3000 obratih.
3. Po končanem centrifugiranju odčitamo višino stolpcev eritrocitov v posameznih cevkah.

**c) Naloge:**

- Grafično prikažite rezultate! (abscisa- koncentracija raztopine, ordinata- višina stolpca eritrocitov)
- Razložite razmerje med višino stolpca eritrocitov in koncentracijo raztopine!

### 1.4.4 Aktivni transport

Pri aktivnem transportu se topljenci premikajo s področij z nižjo na področja z višjo koncentracijo (proti koncentracijskemu gradientu), za kar je potrebna energija. Pri tem se topljenci (podobno kot pri olajšani difuziji) vežejo na nosilce v celični membrani. Ker se topljenci premikajo proti višji koncentraciji, nosilce imenujemo tudi črpalke. Energijo za aktivni transport črpalke dobijo s cepljenjem ATP. Ob tem se spremeni njihova konfiguracija. Z aktivnim transportom se prenašajo ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{H}^+$ . Najbolj znana dvosmerna črpalka v organizmu je Na-K črpalka, ki  $\text{Na}^+$  odstranjuje iz celice,  $\text{K}^+$  pa vnaša vanjo. Za vsaka 2  $\text{K}^+$ , ki prideta v celico, se navzven prenesejo 3  $\text{Na}^+$ .

Aktivni transport lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx (poglavje **Mehanizmi celičnega transporta in permeabilnost (Cell Transport Mechanisms and Permeability)**), vaja **Poskus/Aktivni transport (Experiment/Active Transport)**). Sistem za prikaz aktivnega transporta je podoben kot v prejšnjih računalniških simulacijah (slika 1.6). Glavna razlika je sistem za dodajanje ATP na vrhu vsake čaše in možnost dodajanja ionov  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . Dodajanje ATP je nujno za delovanje sistema, zato ga moramo dodajati ob vsakem poskusu.

#### a) Postopek:

1. Na števcu enote za pripravo membran na prikazu za  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalko izberemo vrednost 0. Z ukazom **Build Membrane** to aktiviramo in jo premestimo v nosilec med obema valjema. Števila glukoznih nosilcev (500) ne spreminjamo!
2. Pod levim valjem pripravimo 9 mM raztopino  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , pod desnim pa 9 mM raztopino  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  in z ukazom **Dispense** napolnimo oba valja.
3. Količino ATP nastavimo na 0 mM in izberemo ukaz **Dispense ATP**.
4. Čas nastavimo na 120 min in z ukazom **Start** poženemo poskus. Rezultat meritve zapišemo.
5. Po končani meritvi odstranimo membrano in z ukazom **Flush** speremo valja.
6. Ponovimo stopnje 1 do 5, s tem da v membrano vgradimo 500  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalk. Rezultat meritve zapišemo.
7. Postopek od 1. do 5. ponovimo tako, da levi valj napolnimo z 9 mM raztopino  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , desnega z 9 mM raztopino  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . Število  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  črpalk naj bo ves čas 500, spreminjamo pa količino ATP (2 in 4 mM).
8. Poskus še enkrat ponovimo tako, da levi valj napolnimo z 9 mM raztopino  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , desnega pa z 9 mM raztopino  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . Meritve izvedemo s 4 mM ATP, spremenimo pa število črpalk (250, 750).

#### b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Ali so ioni prehajali skozi membrano, če je bila na eni strani  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , na drugi pa  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ? Kateri topljenec je prehajal, v kateri smeri?
  - Ali povečevanje količine ATP vpliva na transport ionov skozi membrano?
  - Ali povečevanje števila črpalk vpliva na transport ionov?
  - Kakšno je bilo ob koncu vsakega poskusa razmerje med koncentracijo  $\text{K}^+$  v levem in  $\text{Na}^+$  v desnem valju?
  - Ali bi  $\text{Na}^+$  prehajali skozi membrano, če bi bila v desnem valju destilirana voda?

Topljenec	Št. črpalk Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	ATP [mM]	Začetna koncentracija		Končna koncentracija		Čas prehoda (min)
			levi valj [mM]	desni valj [mM]	levi valj [mM]	desni valj [mM]	
Na <sup>+</sup>	0	0	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			
Na <sup>+</sup>	500	0	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			
Na <sup>+</sup>	500	2	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			
Na <sup>+</sup>	500	4	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			
Na <sup>+</sup>	250	4	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			
Na <sup>+</sup>	750	4	9	0			
K <sup>+</sup>			0	9			

## 1.5 FIZIOLOŠKE RAZTOPINE

Pri delu z izoliranimi organi moramo preprečiti njihovo izsuševanje, kajti to povzroča motnje v njihovem delovanju. Izsuševanje preprečimo s prelivanjem ali vlaganjem izoliranih organov v različne izotonične raztopine, ki jim zaradi svoje ugodne elektrolitske sestave omogočajo optimalno delovanje. Take raztopine imenujemo **fiziološke raztopine**. Fiziološke raztopine lahko vbrizgamo tudi živim živalim v ožilje ali v podkožje (npr. ob dehidraciji organizma).

Glavna sestavina fizioloških raztopin je NaCl, poleg tega lahko tudi glukoza in nekatere soli, npr. kloridi, fosfati in karbonati.

- **Glede na število soli**, ki jih sestavljajo, razlikujemo enostavne in sestavljene fiziološke raztopine. **Enostavna** fiziološka raztopina vsebuje samo NaCl, **sestavljene** pa tudi manjše količine drugih soli (tabela 1.5).
- **Glede na uporabnost** raztopin za vrsto živali razlikujemo fiziološke raztopine za toplokrvne živali, za hladnokrvne kopenske živali, za žuželke, polže, ribe, morske nevretenčarje itd. (tabela 1.6).
- Poleg tega razlikujemo tudi fiziološke raztopine **za posamezne organe** živali (tabela 1.5), npr. Ringerjevo raztopino, Tyrodejevo raztopino za delo z izoliranim ileumom, Lockovo za delo s srcem, Crebsovo za delo z izoliranimi odrezki diafragme, Jalenovo za delo z odrezki maternice itd.

Koncentracije fizioloških raztopin za različne vrste živali lahko izračunamo z določanjem točke znižanja zmrzišča. Zmrzišče krvi sesalcev ( $\delta t$ ) se nahaja pri približno  $-0,56\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kar ustreza osmotskemu tlaku 680 kPa, vendar pa obstajajo tudi pri domačih živalih medvrstne razlike (npr. prašič  $-0,615\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mačka  $-0,538\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Zmrzišče krvi hladnokrvnih živali je pri  $-0,42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , morskih rib pri  $-1,08\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hemolimfe morskih nevretenčarjev pa celo pri  $-2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Če želimo izračunati izotonično raztopino neke snovi za določeno živalsko vrsto, uporabimo formulo:

$$C = \frac{\delta t \text{ krvi} \times M}{\delta M \times N_i}$$

( $C$  – koncentracija izotonične raztopine,  $M$  – molekulska masa,  $\delta M$  – konstanta ledišča,  $N_i$  – število ionov, na katere disociira elektrolit (neelektroliti –  $N_i = 1!$ ))

#### Naloge:

- Izračunajte koncentracijo izotonične raztopine NaCl in glukoze!

**Tabela 1.5:** Fiziološke raztopine za delo z nekaterimi organi toplokrvnih živali

Snov [g]	Slana	Ringerjeva	Tyrodejeva	Lockova	Crebsova
NaCl	9,0	9,5	8,0	9,0	6,9
KCl	–	0,2	0,2	0,42	0,35
CaCl <sub>2</sub>	–	0,2	0,2	0,24	0,28
MgCl <sub>2</sub>	–	–	0,1	–	–
NaHCO <sub>2</sub>	–	–	1,0	0,15	2,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	–	–	0,05	–	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	–	–	0,16
glukoza	–	–	1,0	1,0	2,0
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	–	–	–	0,29	–
H <sub>2</sub> O dest. [ml]	do 1000	do 1000	do 1000	do 1000	do 1000

**Tabela 1.6:** Fiziološke raztopine za hladnokrvne živali (žabe)

Snov [g]	Slana	Ringerjeva (srce)	Ringerjeva (elektrofiziologija)
NaCl	6,5	6,5	6,5
KCl	–	0,14	0,18
CaCl <sub>2</sub>	–	0,12	0,2
NaHCO <sub>2</sub>	–	0,2	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	–	–	0,1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	0,3
glukoza	–	2,0	–
H <sub>2</sub> O dest. [ml]	do 1000	do 1000	do 1000

## 1.6 DOLOČANJE DELEŽA VODE V TKIVIH

Voda je količinsko najpomembnejši sestavni del organizma, saj predstavlja več kot polovico telesne mase sesalcev. Ima številne fizikalne in fizikalno-kemične lastnosti, ki imajo odločilen pomen za življenjske procese. Delež vode v organizmu je odvisen od vrste živali, njene starosti (s starostjo upada) in rejnega stanja (mršavi osebkovi imajo večji delež vode kot zamaščeni). Prav tako je različna v različnih tkivih in organih.

**a) Material:** organi klavnih ali poskusnih živali (jetra, mišice, srce, koža, ledvica, pljuča, kosti, kri), tehtiči, tehtnica in električni sušilnik.

**b) Postopek:**

1. Stehtamo prazne tehtiče.
2. V vsak tehtič damo za grahovo zrno velik vzorec tkiva, ki smo ga predhodno osušili s filtrirnim papirjem, in stehtamo tehtič skupaj z vzorcem.
3. Odrpte tehtiče damo v sušilnik na 105 °C za 2 uri.
4. Ohlajene in pokrite tehtiče s posušenimi vzorci stehtamo.
5. Izračunamo delež vode po eni od spodnjih formul:

$$\% \text{ vode} = 100 \% - \left( \frac{\text{sui vzorec [g]}}{\text{sveži vzorec [g]}} \times 100 \% \right)$$

ali:

$$\% \text{ vode} = \frac{\text{sveži vzorec [g]} - \text{sui vzorec [g]}}{\text{sveži vzorec [g]}} \times 100 \%$$

**c) Naloge:**

1. Izračunajte vsebnost vode v vzorcih različnih tkiv!
2. Rezultate meritev vnesite v zbirno tabelo!

Tkivo/organ	Delež vode [%]	
	Izmerjeni	Dejanski

## 1.7 TELESNE MERE DOMAČIH ŽIVALI IN BIOMETRIJA

Za razumevanje in kvantitativno ovrednotenje fizioloških procesov v telesu živali moramo poznati njihove telesne mere. Osnovne dimenzije živali so telesna masa, višina in dolžina.

### 1.7.1 Telesna masa

Telesna masa je izražena v ustreznih utežnih enotah. Okvirne vrednosti telesne mase nekaterih živalskih vrst prikazuje tabela 1.7.

Pri vrednotenju nekaterih procesov je potrebno včasih upoštevati tudi korigirano ali "mršavo" telesno maso. To je masa brez maščobnega tkiva. Pri velikih domačih živalih lahko vrednost približno ocenimo in izrazimo delež maščobnega tkiva v odstotkih. Natančnejšo vrednost dobimo iz izračuna specifične teže telesa, ki se dobi po tehtanju v zraku in po ponovnem tehtanju v vodi, pri čemer se upošteva korekcija za volumen zraka v pljučih. Razlika med rezultatoma, dobljenima po tehtanju v vodi in v zraku, predstavlja volumen izpodrinjene vode. Vrednost tehtanja v zraku, deljena z vrednostjo mase izpodrinjene vode, nam da podatek o specifični teži. Organizmi, ki imajo veliko maščobnega tkiva, imajo nižjo specifično težo. Maščoba ima namreč specifično težo 0,9, druga tkiva pa več, kosti npr. celo 1,56.

**Tabela 1.7:** Telesna masa nekaterih živalskih vrst

Vrsta živali	Telesna masa
kolibri	10 g
miš	20 g
podgana	400 g
kunec	3–5 kg
pes: majhne pasme	3–5 kg
srednje pasme	5–15 kg
velike pasme	15–50 kg
mačka	2–3 kg
prašič	100–150 kg
drobnica	30–70 kg
govedo	500–700 kg
konj	400–800 kg
kamela	1000 kg
slon	3000–3500 kg
kit	10000 kg

Predvsem pri manjših živalih merimo telesno maso večinoma s tehtanjem. Včasih pa je potrebno telesno maso živali določiti z merjenjem njene višine, dolžine in obsega prsnega koša ter uporabiti posebne formule.

### 1.7.2 Telesna dolžina in višina

Telesna dolžina je praviloma v dolžinskih enotah izražena dolžina telesa od najbolj kranialne do najbolj kaudalne točke telesa. Ker je živim domačim živalim težko izmeriti to dolžino, se pri praktičnih meritvah uporabljajo druge vrednosti. Najpogosteje se meri dolžina telesa od vihra ali od področja tilnika do korena repa. Pri majhnih živalih z dolgim repom (podgane, miši in druge vrste glodavcev) posebej merimo dolžino telesa in glave in posebej dolžino repa. Pri pticah merimo razpon kril od telesa do vrha kril.

Kot telesna višina se pri domačih živalih upošteva višina od stojišča živali do vihra, pri ljudeh pa vrednost od podporne ploskve stojišča do vrha temena.

### 1.7.3 Telesna površina

Pri vrednotenju procesov bazalnega metabolizma ali učinkovitosti ekskrecije je večkrat potrebno upoštevati tudi telesno površino. To vrednost izračunamo na osnovi nekaterih formul.

Po **Meehu** izračunamo telesno površino s formulo:

$$P = k \times \sqrt[3]{g^2}$$

(*P* – telesna površina, *k* – Meehova konstanta, *g* – telesna masa)

Meehove konstante za različne vrste živali so podane v tabeli 1.8.

Po **Benedictu** lahko kot srednjo vrednost faktorja za izračunavanje telesne površine vzamemo vrednost 10, formula **po Du Boisu** pa upošteva telesno maso in dolžino pri živalih oziroma višino pri ljudeh:

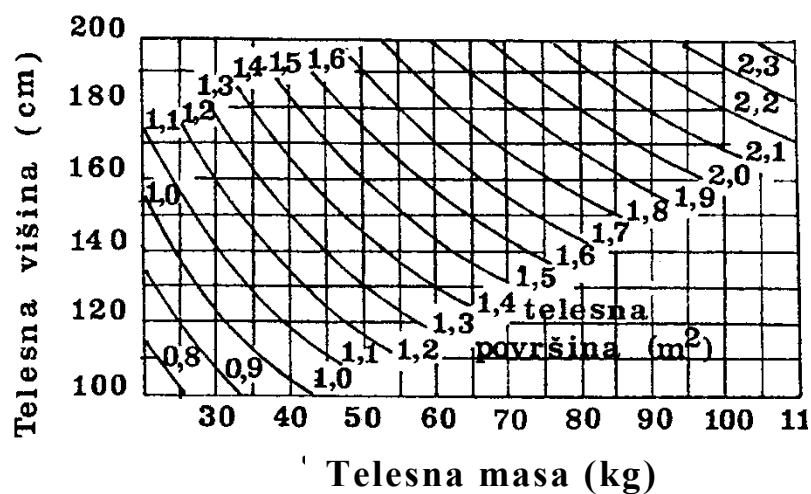
$$P = 167,2 \times \sqrt{g \times h}$$

(*P* – telesna površina, 167,2 – konstanta, *g* – telesna masa, *h* – telesna dolžina ali višina)

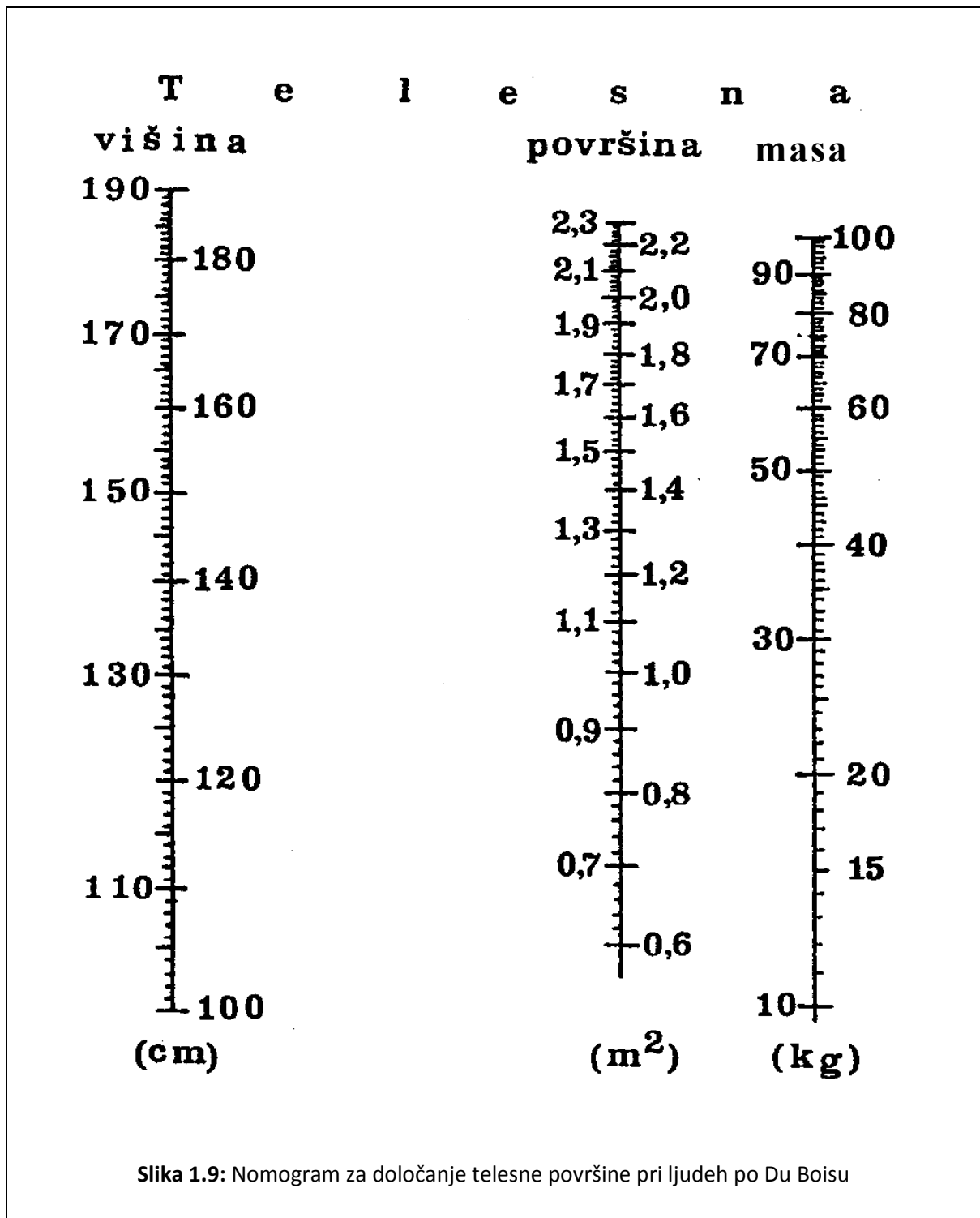
Za določanje površine pri ljudeh so izdelani posebni nomogrami, iz katerih lahko neposredno odberemo vrednost. Prikazujeta jih slici 1.8. in 1.9.

**Tabela 1.8:** Meehove konstante za nekatere živalske vrste in človeka

Vrsta živali	Konstanta
konj	9,0–9,9
žrebe	11,0
govedo	9,0
tele	10,5
ovca	8,5–12,1
jagnje	10,2
koza	10,6
prašič	8,7–9,9
odojek	10,0–11,3
pes	10,7–11,2
mačka	9,9
budra	8,5
podgana	9,1
kokoš	10,4–10,5
gos	10,5
človek	12,3



**Slika 1.8:** Nomogram za določanje telesne površine pri ljudeh po Boothbyju in Sandidorfu





## 2 FIZIOLOGIJA ŽIVCEV IN ČUTIL

### 2.1 NEVRONI IN ŽIVČNI IMPULZ

Nevroni imajo dve pomembni fiziološki lastnosti – **vzdražljivost** (zmožnost odgovora na dražljaj z nastankom živčnega impulza) in **prevodnost** (zmožnost prenašanja dražljaja).

V mirujočem nevronu je električni naboj zunaj membrane pozitiven, znotraj pa negativen. Razlika med nabojema znotraj in zunaj celice je **membranski potencial v mirovanju**. Z mehanizmom aktivnega transporta ga vzdržuje Na-K črpalka v membrani. Če nevron vzdražimo z dražljajem ustrezne napetosti, membrana za kratek čas postane prepustna za  $\text{Na}^+$ , ki prodrejo v celico in povzročijo depolarizacijo membrane (zmanjšata se pozitivni naboj na zunanji in negativni naboj na notranji površini). Ko depolarizacija doseže določeno stopnjo, imenovano prag, se začne **akcijski potencial**, ki se kot val depolarizacije naglo širi vzdolž membrane. Ko membranski potencial doseže vrednost 0 mV, se  $\text{Na}^+$  kanalčki začnejo zapirati,  $\text{K}^+$  kanalčki pa odpirati, kar omogoči pretok  $\text{K}^+$  ionov iz celice in repolarizacijo membrane, ki ponovno vzpostavi membranski potencial v mirovanju.

Med depolarizacijo je membrana popolnoma neobčutljiva za dodatne dražljaje ne glede na njihovo velikost. Tedaj je celica v **absolutni refraktorni periodi**. Med repolarizacijo pa membrano lahko stimulirajo le zelo močni dražljaji, kar imenujemo **relativna refraktorna perioda**. Ko se akcijski potencial enkrat začne, poteka sam od sebe in se hitro širi vzdolž membrane nevrona. Pri tem sledi **zakonu vse ali nič** (membrana nevrona se depolarizira v celoti ali pa sploh ne). Akcijski potencial v nevronih se imenuje **živčni impulz**. Ko doseže konec nevrona, sproži sproščanje neurotransmiterjev v sinaptično zvezo, odvisno od sinapse, bodisi zavre ali vzdraži postsinaptični nevron.

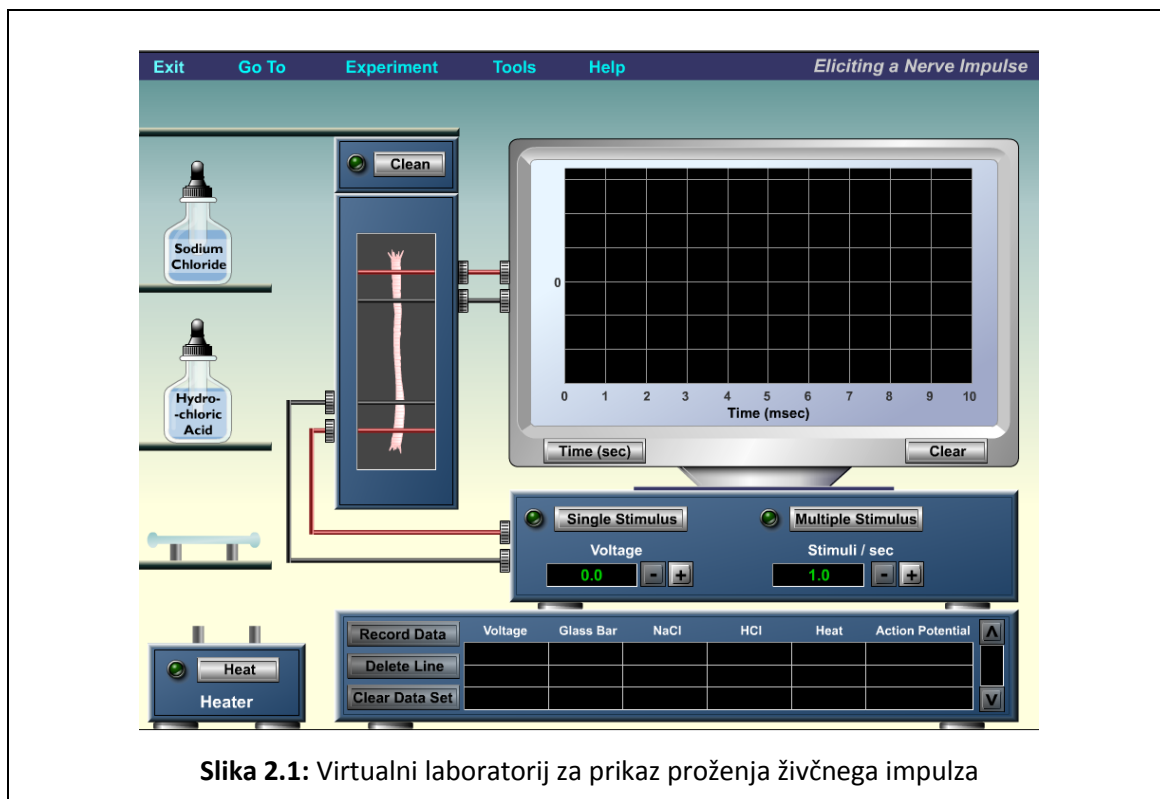
Živčni impulz (akcijski potencial) in dejavnike, ki sprožijo ali zavrejo njegov nastanek ter vplivajo na hitrost prenosa, lahko prikažemo z računalniško simulacijo PhysioEx (poglavje **Nevrofiziologija in živčni impulzi (Neurophysiology and Nerve impulses)**). Simulacija je pripravljena na osnovi meritev, opravljenih v nevrofizioloških laboratorijih na živcih žab in podgan.

#### 2.1.1 Nastanek živčnega impulza

Nastanek akcijskega potenciala lahko povzročijo različni kemični, fizikalni (toplotni in mehanski) ali električni dražljaji.

Virtualni laboratorij za prikaz nastanka sestavljenega živčnega impulza (**Compound Action Potential – CAP**) (slika 2.1) odpremo z izbiro poglavja **Proženje živčnega impulza (Eliciting nerve impulse)**. Na desni strani virtualnega laboratorija so enota za prikaz in shranjevanje podatkov (spodaj), električni stimulator (na sredini) in osciloskop (zgoraj). Levo od osciloskopa je komorica, v kateri je nameščen preparat (izoliran ishiadični živec žabe), ob komorici pa sta polički s kemikalijami. Električni stimulator posreduje električne impulze enosmernega toka, katerih trajanje, frekvenco in napetost je mogoče natančno uravnavati. Električni impulzi po elektrodah prehajajo do komorice s preparatom, registracijski elektrodi pa preparat povezujeta z

osciloskopom. Na ekranu osciloskopa opazujemo odgovor preparata na dražljaj (ravna črta – vzburjenja ni, krivulja – nastanek akcijskega potenciala). Ob koncu poskusa rezultate lahko natisnemo z ukazom **Tools/Print**.



### A) Električna stimulacija živca

#### a) Postopek:

1. Z izbiro oznak (+) oz. (–) pod oznako **Voltage** izberemo napetost 1 V.
2. Izberemo ukaz za posamezni dražljaj (**Single Stimulus**) nad prikazom napetosti. Če odgovora na dražljaj ni, kar vidimo kot ravno črto na osciloskopu, draženje ponavljamo s postopnim povečevanjem napetosti za 0,5 V toliko časa, dokler ne nastane odklon krivulje na osciloskopu zaradi nastanka sestavljenega akcijskega potenciala v živcu (**prag dražljaja!**). Sproti zapisujemo rezultate (**Record Data**).
3. Postopoma povečujemo napetost za 0,5 V in ponavljamo postopek, opisan pod 2. točko, dokler se amplituda zapisa povečuje.

#### b) Naloge:

1. Narišite zapis sestavljenega akcijskega potenciala in označite elemente!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Pri kateri napetosti ste prvič opazili sestavljen akcijski potencial?
  - Kako se je zapis spreminjal s povečevanjem napetosti dražljaja? Razložite vzrok za razlike!
  - Pri kateri napetosti je bil dosežen največji sestavljen akcijski potencial?

### **B) Mehanska stimulacija živca**

**a) Postopek:**

1. Z ukazom **Clear** izbrišemo zapis na osciloskopu.
2. Stekleno palčko, ki se nahaja na podstavku na levi strani ekrana, premaknemo v komoro z živcem. Opazujemo zapis na osciloskopu.

**b) Naloge:**

Opišite zapis, ki ga dobite na ekranu osciloskopa, in ga primerjajte z zapisi, dobljenimi pri 1. poskusu!

### **C) Toplotna stimulacija živca**

**a) Postopek:**

1. Ponovimo postopek, opisan pod točkama 1. in 2. prejšnjega poskusa.
2. Stekleno palčko premaknemo na grelec pod podstavkom in izberemo ukaz **Heat**. Ko palčka postane rdeča, jo premaknemo v komoro z živcem.

**b) Naloge:**

1. Opišite zapis, ki ga dobite na ekranu osciloskopa, in ga primerjajte z zapisom, dobljenim pri prejšnjem poskusu!
2. Razložite nastale razlike!

### **Č) Kemična stimulacija živca**

**a) Postopek:**

1. Kapalko iz stekleničke z NaCl premaknemo v komorico s preparatom; nekaj kapljic raztopine kane na preparat.
2. Preparat dražimo z električnim dražljajem nad pragom, ki smo ga določili v 1. poskusu.
3. Z ukazom **Clean** nad komoro z živcem operemo živec in ga povrnemo v začetno stanje. Z ukazom **Clear** zbrisemo zapis na osciloskopu.
4. Draženje ponovimo s HCl po enakem postopku, kot je opisano v 1. in 2. točki.

**b) Naloge:**

Odgovorite na spodnja vprašanja:

- Ali je prelivanje z NaCl oz. HCl povzročilo nastanek akcijskega potenciala?
- Ali se je zapis razlikoval od tistega, ki smo ga zapisali pri električnem draženju živca?
- Razložite nastale razlike!

### 2.1.2 Inhibicija živčnega impulza

Številni fizikalni in kemični dejavniki oslabijo delovanje živčnega vlakna. Tako npr. visok krvni tlak in nizka temperatura upočasnijo hitrost prevajanja živčnega impulza zaradi zmanjšane lokalne oskrbe s krvjo. Tudi lokalni anestetiki, alkohol in številne druge kemikalije blokirajo prenos živčnih impulzov. Poskus prikazuje učinek različnih dejavnikov na prenos živčnega impulza.

Simulacijo poženemo z ukazom **Inhibicija živčnega impulza (*Inhibiting a nerve impulse*)** iz menija poskusa. Virtualni laboratorij je podoben kot pri prejšnji seriji poskusov (slika 2.1), s tem da so na desni strani ekrana stekleničke s kemikalijami, s katerimi testiramo delovanje živca.

#### **A) Delovanje etra**

Eter povzroča začasno paralizo živčnih celic, zato se je v preteklosti uporabljal kot narkotik pri ljudeh in živalih.

##### **a) Postopek:**

1. Kapalko iz stekleničke z etrom premaknemo do komorice z živcem; nekaj kapljic raztopine kane na preparat.
2. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo preparat; uporabimo nastavitev za prag dražljaja, ki smo ga določili pri prvi skupini poskusov.
3. Izberemo ukaz za čas (**Time**) na osciloskopu. Na ekranu osciloskopa bomo aktivnost živca opazovali 10 minut (interval med vsako navpično črto znaša 1 minuto). Zaradi spremembe časovne skale bo akcijski potencial videti kot oster zobec.
4. Z izbiro oznake (+) v oknu za interval med dražljaji (**Interval between stimulus**) izberemo 2 minuti. Zato bo stimulator vzdražil živec vsaki 2 minuti. Z ukazom **Stimulate** poženemo simulacijo in opazujemo prikaz v oknu pretečenega časa (**Elapsed Time**).
5. Ob koncu poskusa z ustreznimi ukazi zberemo vse nastavitve in živec povrnemo v prvotno stanje.

##### **b) Naloge:**

1. Opišite zapis sestavljenega akcijskega potenciala ob stimulaciji, ki sledi prelivanju živca z etrom!
2. Odgovorite na spodnji vprašanji:
  - Kaj se je zgodilo z živcem po prelivanju z etrom?
  - Kako dolgo traja, da se delovanje živca povrne na normalno?

#### **B) Delovanje kurareja**

Kurare je rastlinski izvleček, ki ga južnoameriški Indijanci uporabljajo za paraliziranje plena. Je alfa-toksin, ki blokira holinergične receptorje v postsinaptičnih membranah, kar onemogoči delovanje acetilholina. Na ta način kurare prepreči prehajanje živčnih impulzov od nevrona do nevrona.

##### **a) Postopek:**

1. Kapalko iz stekleničke s kurarejem premaknemo do komorice z živcem; nekaj kapljic raztopine kane na preparat.
  2. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo preparat; uporabimo nastavitev za prazen dražljaj, ki smo ga določili v prvi skupini poskusov.
  3. Ob koncu poskusa z ustreznimi ukazi zberemo vse nastavitve in živec povrnemo v prvotno stanje.
-

### b) Naloge:

1. Kako je kurare deloval na sestavljeni akcijski potencial? Razložite učinek!
2. Kakšen bi bil učinek kurareja na celotni organizem?

### C) Delovanje lidokaina

Lidokain zavira ali popolnoma prepreči prehod ionov skozi membranske kanalčke nevronov in zato onemogoča nastanek depolarizacije in širjenje akcijskega potenciala po nevronu. V veterinarski medicini se uporablja kot lokalni anestetik.

### a) Postopek:

1. Kapalko iz stekleničke z lidokainom premaknemo do komorice z živcem; nekaj kapljic raztopine kane na preparat.
2. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo preparat; uporabimo nastavitev za pražni dražljaj, ki smo ga določili v prvi skupini poskusov.
3. Ob koncu poskusa z ustreznimi ukazi zberšemo vse nastavitve in živec povrnemo v prvotno stanje.

### b) Naloge:

1. Kako je lidokain deloval na sestavljen akcijski potencial? Razložite učinek!
2. Kakšen bi bil učinek lidokaina na celotni organizem?

## 2.1.3 Hitrost prenosa impulza po živcu

Ena od pomembnih lastnosti živčnih vlaken je **prevodnost** – zmožnost prenašanja živčnih impulzov do drugih nevronov, mišic ali žlez. Hitrost prenosa vzbujenja je odvisna od debeline in tipa živčnega vlakna. Prenos po mieliniziranih vlaknih je hitrejši kot po nemieliniziranih. Električni impulzi se po prevodnikih prenašajo s svetlobno hitrostjo, prenos akcijskega potenciala po živčnem vlaknu pa je mnogo počasnejši. V nekaterih žvcih sesalcev je ta hitrost 120 m/s, v drugih pa celo samo 3 m/s.

Poskus poženemo z izbiro poglavja **Hitrost prenosa dražljaja po živcu (Nerve Conduction Velocity)** iz menija poskusa. Virtualni laboratorij je podoben kot pri prejšnjih poskusih, le da pri tej seriji poskusov poleg osciloskopa in stimulatorja uporabljamo še **ojačevalnik (Bio-amplifier)**, ki vsako depolarizacijo membrane okrepi toliko, da jo osciloskop lahko zazna in prikaže. Na levi strani ekrana so živci različnih vrst živali, ki se med seboj razlikujejo po debelini in mielinizaciji. Najmanjši živec, ki se uporablja pri poskusu, je živec deževnika. Ta ni prepariran, ker poteka po ventralni površini telesa. Preparirani živec žabe je srednje debel in mieliniziran. Prvi živec podgane je enako debel kot živec žabe, vendar nemieliniziran. Drugi živec podgane je najdebelejši od vseh prepariranih in je mieliniziran.

**Merjenje hitrosti prenosa impulza****a) Postopek:**

1. Na stimulatorju izberemo ukaz **Pulse**.
2. Prižgemo ojačevalnik (s pomikom vodoravnega stikala navzgor).
3. Kapalko iz stekleničke z etanolom premaknemo do deževnika in ga prelijemo z nekaj kapljicami etanola, kar ga bo sicer narkotiziralo, vendar ne bo vplivalo na prenos dražljaja po živcu.
4. Deževnika premaknemo v komorico za stimulacijo. Njegovo telo mora segati preko vseh stimulacijskih in merilnih elektrod.
5. Na stimulatorju izberemo napetost 1 V (s tipkama **(+)** oz. **(-)** ob prikazu napetosti. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo preparat in opazujemo zapis na osciloskopu. Če akcijskega potenciala ni, postopoma povečujemo napetost toliko časa, dokler ne registriramo odklona v zapisu. Zapišemo prag dražljaja.
6. Izberemo ukaz za meritev (**Measure**) na stimulatorju. Na levi strani ekrana osciloskopa se bo prikazala rumena navpična črta. S tipko **(+)** ob prikazu časa (pod oznako **Measure**) premaknemo navpično črto po ekranu do točke, kjer se ravna črta zapisa začne dvigati. V prikazu časa lahko odčitamo, kolikšen čas je potekel od trenutka draženja do reakcije preparata (= reakcijski čas).
7. Z ukazom **Record Data** shranimo podatke. Program avtomatsko izračuna hitrost prenosa impulza. V tabeli je naveden tudi podatek za razdaljo (**Distance (mm)**), ki je vedno 43 mm, predstavlja pa razdaljo med rdečo elektrodo stimulatorja in rdečo elektrodo za registracijo.
8. Deževnika premaknemo iz komorice in z ukazom **Clear** izbrišemo zapis z ekrana osciloskopa.
9. Stopnje 4 do 8 ponovimo še z ostalimi živali. Po vsakem poskusu shranimo podatke (**Record Data**).

Lastnosti živca	Vrsta živali			
	deževnik	žaba	podgana – 1	podgana – 2
opis				
prag dražljaja [V]				
reakcijski čas [ms]				
hitrost prenosa [m/s]				

**b) Naloge:**

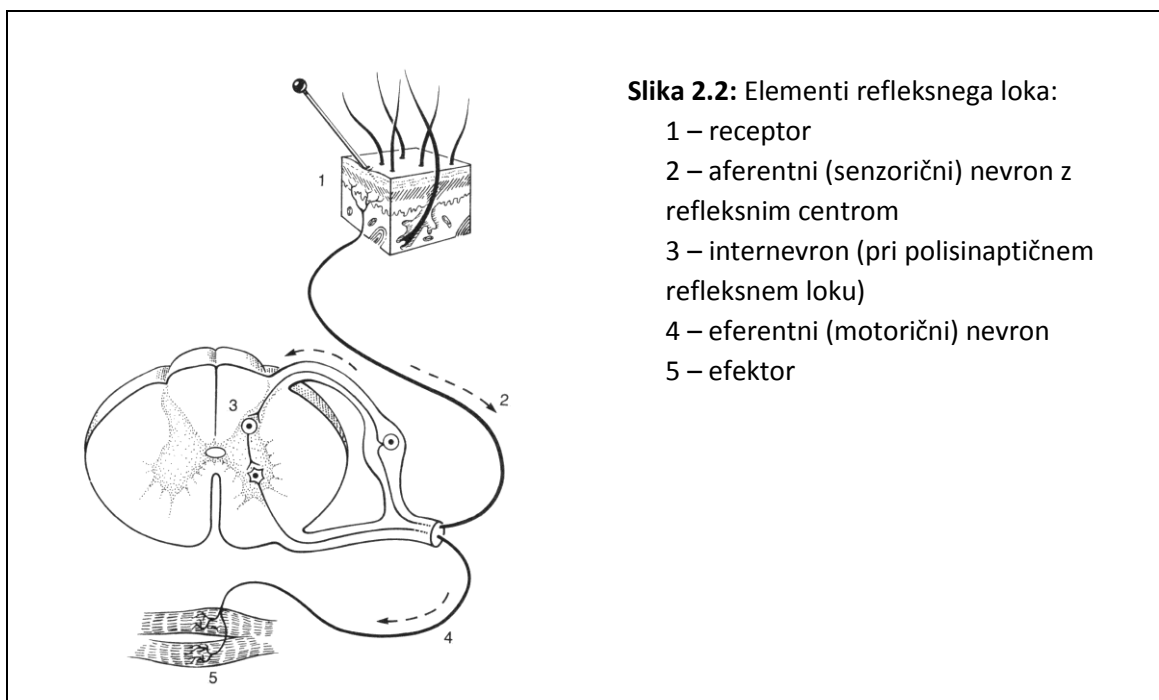
1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Pri kateri vrsti živca je bila hitrost prenosa dražljaja najmanjša oz. največja?
  - Kakšno je razmerje med debelino živca in hitrostjo prenosa dražljaja?
  - Kako mielinizacija živca vpliva na hitrost prenosa?
  - Kaj je glavni vzrok za razliko v hitrosti prenosa med mieliniziranim in nemieliniziranim živcem?

### 2.1.4 Refleksi

Refleksi so osnovna funkcija živčnega sistema. Gre za aktivnost efektornih organov (skeletne, srčne mišice, žleze) kot odgovor na specifičen senzorni dražljaj (draženje receptorjev) brez sodelovanja volje. Pomembni so pri obrambi organizma, homeostazi, kontrolirajo mišične kontrakcije in omogočajo gibanje in držo telesa.

Osnovna funkcionalna in anatomska enota je **refleksni lok** (slika 2.2), ki ga sestavljajo:

- receptor,
- aferentni (senzorični) nevron z refleksnim centrom (somo) v spinalnih ganglijah ali v ganglijah kranialnih živcev,
- eferentni (motorični) nevron, ki izhaja iz ventralnega dela hrbtenjače, in
- efektor, ki je lahko skeletna, srčna ali gladka mišična celica ali žleza.



**Slika 2.2:** Elementi refleksnega loka:

- 1 – receptor
- 2 – aferentni (senzorični) nevron z refleksnim centrom
- 3 – interneuron (pri polisinaptičnem refleksnem loku)
- 4 – eferentni (motorični) nevron
- 5 – efektor

#### A) Klasifikacija refleksov

Refleksne loke razdelimo glede na:

- vrsto eferentnega živčnega sistema, ki kontrolira odgovor (somatski, avtonomni in visceralni refleksi),
- mesto integracije v centralnem živčnem sistemu (spinalni in kranialni refleksi),
- število nevronov v refleksni poti (monosinaptični in polisinaptični),
- nastanek (brezpogojni in pogojni).
  - **Brezpogojni** refleksi so enaki pri vseh predstavnikih iste vrste živali, imajo določena receptorna polja v določenih področjih telesa, draženje teh polj povzroči nastanek refleksov. Delujejo vse življenje.
  - **Pogojni** refleksi nastajajo ob sodelovanju velikih možganov, vendar delujejo neodvisno od volje, pojavljajo pa se z zavestnim doživljanjem nečesa, kar je postalo sestavni del izkušenj. So začasni in lahko izginejo. Nastanejo, če se hkrati vzdražijo različna središča, ki normalno nimajo funkcionalne povezave, in pride do vzpostavitve funkcionalnega stika med njimi. Živali zato specifično reagirajo na prej nespecifične dražljaje. Primer nastanka pogojnih

refleksov so poskusi Pavlova na psih. Nespecifični dražljaj je bil pri tem svetloba ali zvok, specifični pa hrana; pes je izločal slino že ob nespecifičnem dražljaju, če so pred tem oba dražljaja nekaj časa izvajali hkrati; če na nespecifični dražljaj ni dobil hrane, je refleks počasi zamrl.

### **B) Klinični refleksi**

Nekatere reflekse lahko opazujemo v klinične namene, ker jih (pri živalih in pri ljudeh) ob nekaterih bolezenskih stanjih ali ob poškodbah živčnega sistema ni ali so zavrti ali ojačani. Pogosto testirani klinični refleksi so:

- **Miotatični refleks** je edini refleks v organizmu, ki ima monosinaptični refleksni lok. Receptor pri tem tipu refleksov je mišično vreteno. To so specialno grajena mišična vlakna (t. i. *intrafuzalna* vlakna), ki ležijo vzdolž mišičnih celic in se vzdražijo ob ekstenziji mišice. Senzorična vlakna se končujejo na motoričnih nevronih, ki izhajajo iz hrbtenjače in oživčujejo efektor. Efektor so celice skeletne mišice (t. i. *ekstrafuzalna* vlakna mišic). Ti refleksi so izredno pomembni, saj mišično vreteno omogoča mišici obdržati stalno dolžino. Miotatični refleksi se pojavljajo v vseh skeletnih mišicah organizma, vendar jih je na splošno težko umetno izzvati, razen na nekaterih mestih, npr.:
  - **refleks Ahilove tetive** (z rahlim udarcem perkusijskega kladivca po Ahilovi tetivi izzovemo trzaj stopala kot posledico refleksnega krčenja *m. gastrocnemiusa* po predhodnem iztezanju zaradi udarca),
  - **patelarni refleks** (z rahlim udarcem perkusijskega kladivca po tetivi patele pride do iztezanja *m. quadricepsa*, temu pa sledi skrčenje mišice in iztegnitev goleni naprej).
- **Refleks krčenja (fleksije)** nastane, če na iztegnjeno okončino deluje kak neprijeten dražljaj, ki povzroči njeno refleksno skrčenje. Gre za obrambni refleks, ki ga vzbudi vzdraženje receptorjev za bolečino; organizem se umika s tega področja. V to skupino spadajo npr. refleks svitka, refleks podplata in refleks medparkeljne gube.
- **Navzkrižni refleks iztezanja (ekstenzije)** se na intaktni živali redko pojavlja, vidimo pa ga lahko na živali s prekinjeno hrbtenjačo (spinalni živali). Zanj je značilno refleksno iztezanje ene noge zaradi krčenja druge. Temu refleksu je podoben pojav ob hoji, ko se ena noga dvigne, druga pa iztegne. Praktična uporaba refleksa je možna pri fiksaciji velikih živali.
- **Iztegnitveni (ekstenzorni) refleks stoje** nastane, če pritisnemo na podplatno blazinico psa, kar povzroči, da se noga togo izravna. S tem je omogočena normalna stoja oz. hoja, ker noga ne kleca. Je kombinacija miotatičnega in kožnega (kutanega) refleksa.
- **Refleks praskanja** izzovemo z mehanskim draženjem kože prsnega koša ali vratu psa, zaradi česar se žival popraska. Ta refleks se pojavlja tudi pri spinalni živali.
- **Roženični (kornealni) refleks** sproži rahel dotik roženice (kornee), ki mu sledi refleksno zapiranje očesa. Uporablja se za ugotavljanje globine narkoze (v narkozi refleks izostane).
- **Zenični (pupilarni) refleks** deluje kot avtomatska zaslonka očesa. Nagla osvetlitev očesa v zatemnjenem prostoru povzroči zapiranje pupil (mioza) obeh oči.

#### **Naloge:**

- Izvedite in opišite nekatere klinične reflekse pri človeku!



## 2.2 FIZIOLOGIJA ČUTIL

### 2.2.1 Čutilo za vid

#### **A) Dokaz slepe pege v očesu (po Mariotu)**

Slepa pega (*papilla n. optici*) je mesto na mrežnici, kjer vstopa v oko vidni živec. Na tem mestu ni vidnih čutnic, zato predmeta, katerega slika pade nanj, ne vidimo. Slepo pego v človeškem očesu si najlažje ponazorimo s črno ploščico velikosti 10 × 5 cm, ki ima na eni strani narisan bel krog, na drugi pa križ.

##### **a) Postopek:**

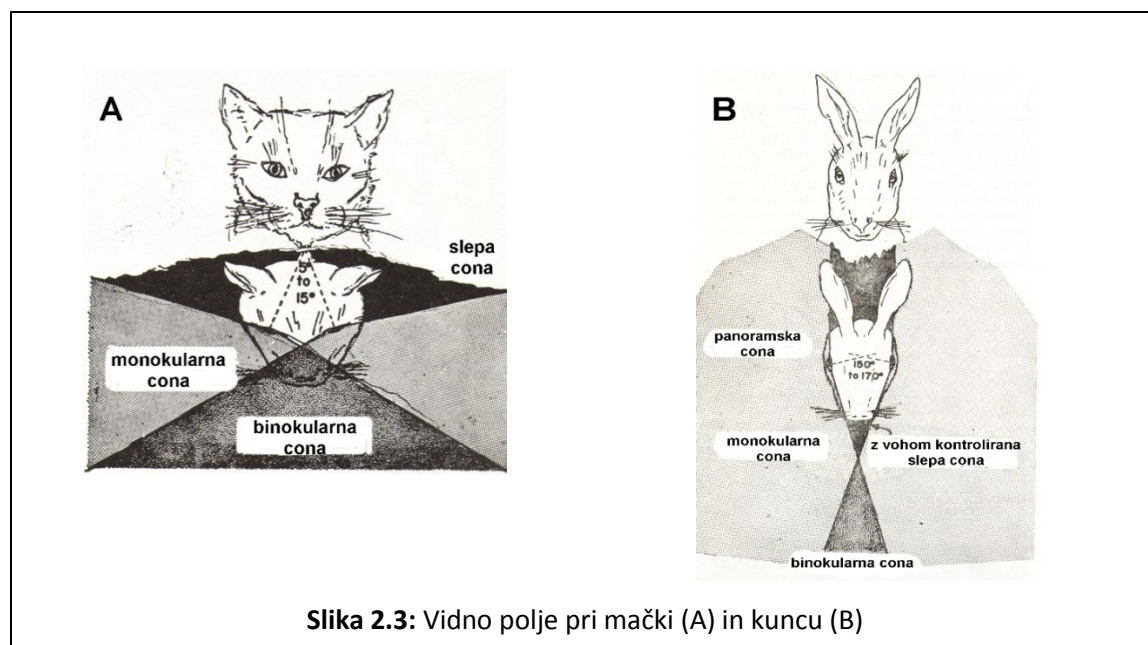
Z dlanjo pokrijemo eno oko, z drugo roko pa držimo sliko pred drugim očesom tako, da je manjši lik obrnjen na tisto stran, na kateri smo oko prekrili. Ko približamo sliko očesu, s katerim ves čas gledamo manjši lik, v določenem trenutku večjega lika ne vidimo, ker v tem položaju pada projekcija lika na slepo pego.

##### **b) Naloge:**

1. Narišite ploščico za dokaz slepe pege!
2. Izvedite Mariotov poskus in določite razdaljo od očesa, pri kateri lik navidezno izgine!

#### **B) Določanje širine vidnega polja (perimetrija)**

Vidno polje je površina, ki jo lahko eno oko zajame s pogledom, ne da bi pri tem menjalo njegovo smer (s fiksiranjem pogleda na eno točko). Vidni polji obeh oči se delno prekrivata, kar omogoča zaznavanje globine in ocenjevanje položaja predmetov v okolici (binokularni vid). Nekatere živali (slika 2.3) imajo binokularno cono zelo široko (npr. pes, mačka), druge pa ozko, vendar z zelo široko, panoramsko cono monokularnega vida (npr. rastlinojedi).



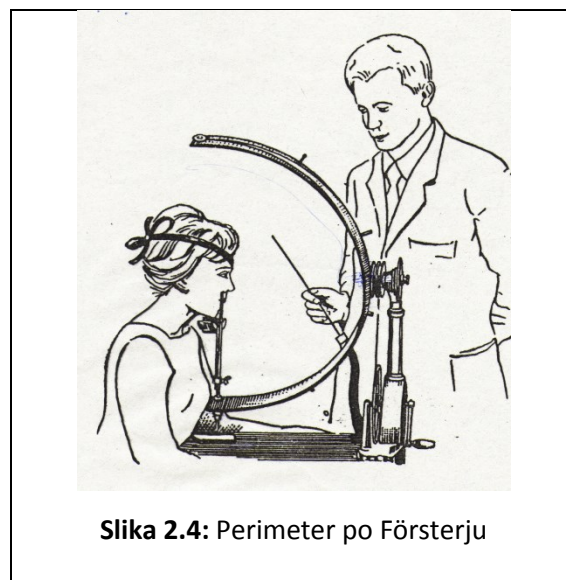
Slika 2.3: Vidno polje pri mački (A) in kuncu (B)

Občutljivost mrežnice je najboljša v centru in slabi proti periferiji (ob dobri osvetlitvi). Ob bolezenskih spremembah ali motnjah na mrežnici, v hiazmi oz. vidnih živcih je na večjih ali manjših področjih lahko njena občutljivost zmanjšana ali je sploh ni, kar lahko registriramo kot spremenjeno obliko vidnega polja. Pri človeku so absolutne meje vidnega polja deloma individualno različne, kar je odvisno od izbočenosti nosu in gornjega roba očesne votline kot tudi od samega očesa.

**Tabela 2.1:** Meje vidnega polja (v kotnih stopinjah) za različne barve

Barva	Nazalno	Navzgor	Navzdol	Temporalno
bela	60	56	65	90–95
modra	50	50	50	70
rdeča	40	40	40	50
zelena	30	30	30	40

Širina vidnega polja je največja za belo barvo, ker so elementi barvnega vida (čepki) locirani v *fovei centralis* in neposredno okoli nje. Posamezne barve imajo v vidnem polju svoje meje (v stopinjah). Za določanje oblike in občutljivosti vidnega polja pri človeku uporabljajo različne vrste perimetrov, v novejšem času pa se meri tudi računalniško. Najbolj enostaven tip te naprave je **perimeter po Försterju** (slika 2.4), ki ga predstavlja lok s polmerom 30 cm. Lok je graduiran v stopinjah in ga lahko vrtimo okoli ničelne točke.



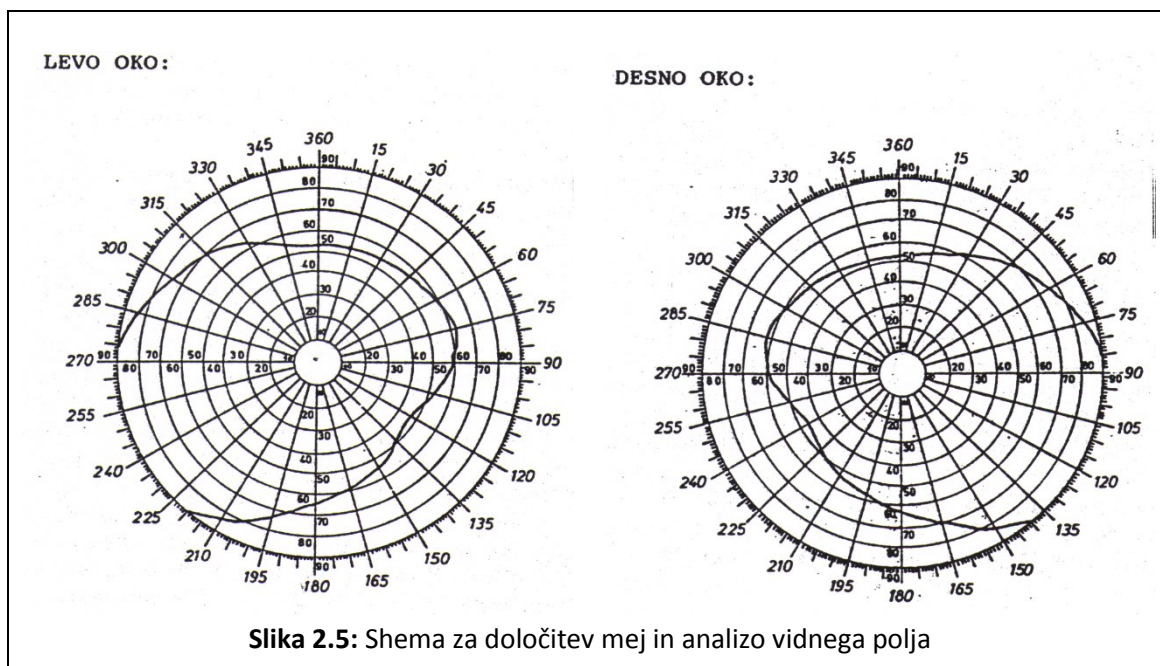
**Slika 2.4:** Perimeter po Försterju

### a) Postopek:

1. Poskusna oseba se z brado nasloni na stojalo pred lokom tako, da je preiskovano oko usmerjeno v središče krivine (drugo oko je zaprto).
2. Po loku pomikamo barvno ploščico do trenutka, ko nam testna oseba pove, da ploščice ne vidi več.
3. Rezultate na različnih meridianih vrišemo v shemo (slika 2.5).

### b) Naloge:

1. S perimetrom določite meje vidnega polja levega in desnega očesa za belo barvo!
2. Meritev ponovite s ploščicami modre, rdeče in zelene barve!
3. Rezultate meritev vnesite v koordinatni sistem na sliki 2.5 in razložite ugotovljene razlike!



### **C) Občutljivost očesa na barve**

Zaznavanje barv je funkcija čepkov v mrežnici, ki se vzdražijo z vidno svetlobo valovne dolžine 350 do 750 nm. Določeni barvi spektra ustreza svetloba določene valovne dolžine: od 380 do 450 nm vijolična, od 450 do 495 nm modra, od 495 do 570 nm zelena, od 570 do 590 nm rumena, od 590 do 620 oranžna in od 620 do 750 nm rdeča.

Za razlago barvnega vida pri človeku obstaja več teorij. Po **Young-Helmholtzovi (trikomponentni)** teoriji obstajajo trije različni tipi čepkov, ki so občutljivi na eno od treh osnovnih barv: rdečo, zeleno ali modro. Vzdraženje različnega števila različnih tipov čepkov povzroči zaznavo različnih barvnih odtenkov. Pri človeku obstajajo motnje v zaznavanju barv z določenimi valovnimi dolžinami – barvna slepota (daltonizem). Osnovni tipi barvne slepote so za rdečo (*protanopija* – rdeče predmete vidijo zeleno), za zeleno (*devteranopija* – zelene predmete vidijo rdeče ali modre) in za modro barvo (*tritanopija* – v vidnem spektru zaznajo zeleno, rumeno, oranžno in rdečo barvo).

#### **a) Postopek:**

Izjava se s posebnimi tablicami (npr. Ishiharine in Stillingove tablice). Te predstavljajo različne slike, sestavljene iz velikega števila pik različnih barv in odtenkov, med katerimi se nahajajo detajli določene barve (npr. črke, številke). Oseba z barvno slepoto podrobnosti na sliki ne bo razločila.

#### **b) Naloge:**

- Z Ishiharinimi tablicami preizkusite, kakšna je vaša sposobnost zaznavanja barv!

### **Č) Naknadni (konsekutivni) kontrast – paslika**

Proces vzdraženja fotoreceptorskih celic ne preneha hkrati s prekinitvijo svetlobnega dražljaja, temveč traja še določen čas po prenehanju draženja. Odvisen je od vrste, intenzivnosti in trajanja svetlobnega dražljaja, od predhodne adaptacije na svetlobo in temo ter drugih faktorjev. Pri nastanku konsekutivnih likov sodeluje tudi skorja velikih možganov, zato se uporabljajo v psihologiji in psihiatriji. Dokaz tega pojava je možen na več načinov.

- **Pozitivni naknadni kontrast** nastane, če nekaj časa opazujemo kak svetel predmet, npr. osvetljen krog. Če nato zapremo oči ali pogledamo na temno površino, lahko še določen čas vidimo sliko tega predmeta v naravni barvi. Pojav je posledica vzdraženja fotoreceptorjev po prenehanju delovanja svetlobnega dražljaja.
- **Negativni naknadni kontrast** nastane, če po opazovanju temnega lika obrnemo pogled na svetlo površino (npr. strop, steno). Je komplementarne barve v primerjavi z opazovanim predmetom. Pojav je posledica prilagoditve nekaterih delov mrežnice na svetlobo (deli retine, na katere so padali svetlobni žarki s temne površine predmeta, so postali občutljivejši kot predeli, na katere so padali žarki z osvetljenih delov predmeta).

#### **Naloge:**

1. Oglejte si različne sličice za prikaz paslik in jih preizkusite!
2. Razložite vzroke za nastanek teh paslik!

### **D) Trenutni kontrast**

Čeprav je čutilo za vid najpreciznejši in najbolj diferenciran analizator, je realna ocena predmetov v veliki meri odvisna od okolice, ki jih obdaja. Predmet sive barve je videti na temni podlagi svetlejši kakor na beli.

#### **Naloge:**

1. Oglejte si različne sličice za prikaz trenutnega kontrasta in jih preizkusite!
2. Razložite vzroke za nastanek opazovanih pojavov!

### 2.2.2 Čutilo za sluh

Zvok je longitudinalno mehansko nihanje molekul določene snovi, ki se kot področja zgotitev in razredčitev (sprememb tlaka) širijo po prostoru. Pri tem ugotavljamo frekvenco zvoka (v hercih – Hz), ki določa njegovo višino, in amplitudo, ki določa jakost oz. glasnost (v decibelih – dB). Razpon sluha je pri različnih živalskih vrstah različen, npr. pri psu do 40000 Hz (ali celo 80000 Hz), pri netopirju pa celo do 98000 Hz. Človek pa zazna frekvenco zvoka od 20 do 20000 Hz.

#### **A) Preizkušanje sluha**

Za preizkušanje sluha lahko uporabljamo različne zvočne dražljaje. Kot izvor zvoka lahko uporabimo elektronske oscilatorje, ki dajejo možnost določanja številnih kvantitativnih podatkov o sluhu (**audiometrija**), kot enostaven kvalitativni preizkus pa lahko uporabimo tudi glasbene vilice.

Pri človeku in živalih obstajajo razlike v sposobnosti zaznavanja visokih in nizkih tonov (visoki toni se bolje slišijo). Pomembno je tudi, pod kakšnim kotom prihaja zvok v uho.

##### **a) Postopek:**

1. Poskusni osebi zavežemo oči in z vato zamašimo eno uho.
2. Nato se postavimo v linijo z drugim ušesom na čim večjo oddaljenost in poženemo mehansko uro (ali šepetamo določene besede).
3. Poskus ponavljamo v različni oddaljenosti in v različnih kotih glede na uho, ki ga preizkušamo.

##### **b) Naloge:**

1. Ugotovite največjo razdaljo, pri kateri poskusna oseba še zazna zvok (tiktakanje ure ali šepet)!
2. Ugotovite, kakšne so razlike v zaznavanju glede na kot, pod katerim prihaja zvok v uho!

#### **B) Preizkus prevajanja zvoka po zraku in po kosti (Rinnejev preizkus)**

Glasbene vilice zanihamo z udarcem ob dlan in jih s spodnjim delom prislonimo na mastoidni podaljšek za uhljem poskusne osebe. V trenutku, ko ne slišimo več zvoka (po približno 60 sekundah), postavimo vilice pred uho – normalno slišimo zvok še približno 30 sekund (**pozitivni Rinnejev znak**). S tem preizkusom dokažemo, da je prevodnost zvoka po zraku boljša kot po kosti. V primeru, da gre za obolenje srednjega ušesa, se pravi dela, ki prenaša zvok, je kostna prevodnost zvoka boljša kot po zraku (**negativni Rinnejev znak**).

##### **Naloge:**

- Preizkusite svoj sluh z glasbenimi vilicami!

### 2.2.3 Čutilo za dotik in bolečino

V koži obstajajo številni tipi receptorjev (npr. prosti živčni končiči, končiči na korenu dlak, Meissnerjeva, Merklova, Ruffinijeva in Paccinijeva telesca). Njihovo vzdraženje povzroča občutke dotika, pritiska, vibracije, toplote in bolečine (so taktilni občutki), ki nastanejo zaradi mehaničnih deformacij tkiva. Število taktilnih receptorjev je v različnih delih kože različno – pri živalih jih je največ na ustnicah in na konici jezika, najmanj pa na hrbtu in na zgornjem delu vratu.

#### **A) Določanje razporeditve receptorjev za dotik**

**a) Material:**

- Esteziometer po Freyu ali šestilo, flomaster, milimetrski papir.

**b) Postopek:**

1. Na kožo poskusne osebe narišemo mrežo s površino 2 cm × 2 cm in ji zavežemo oči.
2. Z esteziometrom se dotikamo kože na površini tega kvadrata. Na milimetrski papir nanašamo točke na osnovi zaznave poskusne osebe. Poskus opravimo na različnih področjih telesa (hrbta stran roke, dlan, podlaket, nadlaket, hrbet).

**c) Naloga:**

- Določite število in razporeditev receptorjev za dotik na različnih področjih telesa!

#### **B) Določanje praga zaznave dveh točk na koži**

**a) Material:**

- Šestilo, ravnilo.

**b) Postopek:**

Poskusni osebi zavežemo oči. Različnih področij na koži se dotikamo s konicama šestila in izmerimo razdaljo, ko oseba pove, da zazna dva dotika hkrati (npr. blazinice prstov – 2 mm, hrbet – 67 mm).

**c) Naloga:**

- Določite prag zaznave dveh točk na različnih področjih telesne površine!

#### **C) Določanje točke termične bolečine**

Povprečna temperatura, pri kateri človek začne čutiti bolečino, je 45 °C. To je temperatura, pri kateri že prihaja do poškodb tkiv. Vzrok za občutek bolečine je verjetno ena ali več kemičnih snovi (bradikinin in njemu podobne snovi), ki se sproščajo iz poškodovanega tkiva in dražijo živčne končiče za bolečino.

**a) Material:**

- Hladna in topla vodovodna voda, večja posoda, termometer.

**b) Postopek:**

V posodo natočimo nekaj hladne vode in vanjo naj poskusna oseba potopi dlan. Počasi dolivamo vročo vodo, dokler poskusna oseba ne začuti bolečine. Tedaj na termometru odčitamo temperaturo vode.

**c) Naloga:**

- Določite temperaturo občutka termične bolečine pri poskusni osebi!

## 2.2.4 Čutilo za okus

Predpostavljamo, da živali razlikujejo enak spekter okusov kot človek. Verjetno ima vsaka živalska vrsta čutilo za okus razvito glede na svoje fiziološke lastnosti in ekološke potrebe. Pri živalih obstajajo glede na zaznavanje okusov individualne in medvrstne razlike. Okuse, ki jih zaznavajo, lahko razdelimo na prijetne, indiferentne in neprijetne. Nekateri poskusi pa kažejo, da živali morda ločijo pet okusov (reagirajo tudi na destilirano vodo).

Čutilo za okus pri živalih lahko preizkušamo na različne načine, npr. s preferenčnimi testi (žival izbira hrano, ki ji ugaja) ali elektrofiziološko (anestezirani živali dajo določeno snov na jezik in registrirajo živčni impulz na *n. glossopharingeusu*).

### Lokalizacija različnih tipov okušalnih receptorjev na jeziku človeka

Človek loči pet osnovnih okusov, ki so odvisni od lastnosti kemičnih snovi, ki delujejo na receptorje okusnega analizatorja (s centrom v velikih možganih). Receptorji za okus zaznajo snovi, ki se topijo v vodi (oziroma slini in sluzi).

Tabela 2.2: Pragi zaznave okusa različnih snovi pri človeku			
Okus	Snov	Mol. masa [g/mol]	Prag [mol/L]
SLADKO	saharoza	342,2	$1 \cdot 10^{-2}$
	glukoza	180,1	$17 \cdot 10^{-2}$
	saharin	241,1	$23 \cdot 10^{-6}$
	BeCl <sub>2</sub>	80,0	$0,3 \cdot 10^{-3}$
SLANO	NaCl	58,5	$1 \cdot 10^{-2}$
	NaI	149,92	$28 \cdot 10^{-3}$
	KCl	74,6	$17 \cdot 10^{-3}$
	NH <sub>4</sub> Cl	53,5	$4 \cdot 10^{-3}$
	CaCl <sub>2</sub>	110,99	$1 \cdot 10^{-1}$
	MgCl <sub>2</sub>	95,23	$15 \cdot 10^{-3}$
	KISLO	HNO <sub>3</sub>	63,1
HCl		36,5	$0,9 \cdot 10^{-3}$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		98,1	$1 \cdot 10^{-3}$
mravljinčna kisl.		46,0	$1,8 \cdot 10^{-3}$
ocetna kisl.		60,1	$1,8 \cdot 10^{-3}$
mlečna kisl.		90,1	$1,6 \cdot 10^{-3}$
GRENKO	maslena kisl.	88,1	$2,0 \cdot 10^{-3}$
	kofein	194,1	$0,1 \cdot 10^{-3}$
	kininsulfat	746,9	$8 \cdot 10^{-6}$
	nikotin	162,2	$19 \cdot 10^{-6}$
	strihninov hidroklorid	370,75	$1,6 \cdot 10^{-6}$
	urea	60,1	$12 \cdot 10^{-2}$
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	246,49	$4,6 \cdot 10^{-3}$

Osnovni okusi, ki jih zaznava človek (tabela 2.2), so slano (disociirane soli), kislo (kislina), grenko (alkaloidi, organske snovi z dolgimi verigami), sladko (ogljikovi hidrati, alkoholi, aldehidi, amidi,

estri, bromove in berilijeve soli, nekatere aminokisljine) in umami (glutamat in nekateri nukleotidi). Receptorji za različne okuse so pri človeku značilno razporejeni na površini jezika: za sladko na konici, za grenko na korenu, za kisló na lateralnih delih in za slano na prednjih lateralnih delih jezika.

**a) Material:**

Raztopine snovi z različnimi okusi (NaCl, saharoze, citronske kisline, kinina), vatirane palčke, kozarec z vodo (za izpiranje ust).

**b) Postopek:**

1. Vatirano palčko namočimo v poljubno raztopino in rahlo pritiskamo na različne dele jezika poskusne osebe.
2. Z zaznavanjem intenzivnosti določenega okusa na določenem področju jezika ugotovimo lego receptorjev za posamezni okus.

**c) Naloge:**

1. Ugotovite področja na jeziku, kjer najintenzivneje zaznavate določeno vrsto okusa!
2. Shematično ponazorite področja za različne okuse na vašem jeziku!

### 2.2.5 Čutilo za vonj

Pomen voha pri živalih je velik, saj s tem čutilom odkrivajo plen, sovražnike in spolne partnerje ter se sporazumevajo. Čutilo za vonj pri sesalcih se nahaja v olfaktornem področju nosne sluznice in se po površini in po številu receptorskih celic močno razlikuje pri posameznih vrstah (npr. nemški ovčar 150 cm<sup>2</sup>, človek okoli 5 cm<sup>2</sup>).

Specifični dražljaj za olfaktorne receptorje so kemične snovi, topne v vodi, ki delujejo na migetalke receptorskih celic. Dolgotrajno draženje receptorjev za vonj povzroči njihovo zasičenje in adaptacijo, posledica je izguba občutka za določen vonj, ki traja nekaj časa. Število snovi z različnimi vonji je ogromno in obstajajo različne razdelitve. Na osnovi psiholoških testov in raziskav akcijskih potencialov predpostavljajo, da obstaja sedem osnovnih vonjev: po kafri, mošusu, cvetni, mentolni, estrski, jedki in gnjlobni.

#### Preizkušanje čutila za vonj

Namen vaje je preizkušanje voha pri človeku s ciljem določiti hitrost adaptacije na določene vonje.

**a) Material:**

- Štoparica, vata, različne dišeče snovi (pepermintovo olje, klinčkovó olje, kafra, cedrovo olje).

**b) Postopek:**

Hitrost adaptacije na določen vonj ugotovimo tako, da vato, natopljeno z določeno dišečo snovjo, postavimo 10 cm od nosu poskusne osebe, ki naj miži in normalno diha. Merimo čas od začetka poskusa do trenutka, ko poskusna oseba ne zazna več vonja določene snovi.

**c) Naloge:**

1. Določite prag zaznave vonja različnih dišečih snovi!
2. Ugotovite čas adaptacije čutila za vonj na različne dišeče snovi!



# 3 FIZIOLOGIJA HORMONALNEGA SISTEMA

## 3.1 METODE DELA V ENDOKRINOLOGIJI

Če želimo poznati in razumeti delovanje hormonalnega sistema, moramo poznati kemično zgradbo hormonov, načine njihove biosinteze, skladiščenja in izločanja, transport in delovanje na ciljne celice ter poti njihove presnove, inaktivacije in izločanja.

### 3.1.1 Metode proučevanja hormonalnega sistema

Za proučevanje hormonalnega sistema lahko uporabljamo poskusne živali, izolirane organe, tkivne rezine, celične kulture ali subcelularne delce. Izbira metode je odvisna od informacij, ki jih želimo pridobiti, in ravni organizacije organizma, na kateri želimo dobiti podatke. Tako npr. splošne učinke in delovanje hormonalnega sistema proučujemo na poskusnih živalih, mehanizme delovanja hormonov pa na izoliranih celicah.

- Prednost **poskusov na živalih** je, da dobimo informacije o odzivih celotnega organizma. Slaba stran teh poskusov je velika biološka variabilnost poskusnih živali in visoka cena, upoštevati pa moramo tudi določena etična načela. Klasični endokrinološki poskusi se delajo na živalih (*in vivo*), ki se jim odstrani določena hormonalna žleza (ali drug organ) in opazuje nastale spremembe. V nadaljevanju poskusa se funkcijo organa skuša na nek način nadomestiti. Organe se živalim najpogosteje odstrani kirurško (npr. hipofizo – hipofizektomija, nadledvično žlezo – adrenaletomija, jajčnike – ovariektomija, itd.). Organe se lahko ohrani tudi znotraj organizma, vendar se jih inaktivira, npr. s kemičnimi snovmi ali denervacijo.
- **Izolirani organi** se uporabljajo za ugotavljanje specifičnih učinkov določenega hormona. Pri tej metodi se izognemo učinkom endogenih snovi, vendar pa je delovanje takih organov težko vzdrževati. Oblika poskusov na organih so poskusi *in situ*, pri katerih organ ostane v organizmu, hormon pa mu apliciramo po njegovem arterijskem krvnem obtoku.
- **Tkivne rezine in celične kulture** (*in vitro* modeli) omogočajo proučevanje delovanja hormonov na celični ravni. Pri presoji rezultatov moramo upoštevati, da so ti modeli v stanju katabolizma in da nanje vpliva medij, v katerem so shranjeni. Pri teh vrstah poskusov se večinoma uporabljajo farmakološke koncentracije hormonov, kar lahko vpliva na rezultate.
- **Subcelularne frakcije** se pridobivajo iz homogeniziranih celic ali tkiv s t. i. diferencialnim centrifugiranjem. Uporabljajo se za študij specifičnih procesov, npr. transport skozi membrano in encimsko aktivnost. Omogočajo predvsem natančne biokemijske študije, vendar pa lahko proizvajajo tudi artefakte in tedaj ne odražajo dogajanj v živem organizmu.

### 3.1.2 Določanje koncentracij hormonov

Hormoni, prav tako pa tudi druge fiziološke ali farmakološke snovi (vitamini, aktivni polipeptidi, protitelesa, antibiotiki, kemoterapevtiki, narkotiki, pomirjevala), se nahajajo v telesnih tekočinah v izredno nizkih koncentracijah. Koncentracija hormonov v krvnem serumu, plazmi, mleku ali urinu je navadno le nekaj mikro-, nano- ali celo pikomolov na liter.

Hormone v krvi in telesnih tekočinah lahko določamo z biološkimi, fizikalno-kemičnimi in imunološkimi metodami.

#### **A) Biološke metode določanja hormonov**

Pri bioloških metodah (tabela 3.1) uporabljamo za določanje koncentracije hormonov biološki material. To so lahko poskusne živali ali izolirani organi. Določanje hormonov z biološkimi metodami je precej nenatančno zaradi nizke občutljivosti in slabe ponovljivosti rezultatov. Zato so zaradi boljših metod večinoma že opuščene.

**Tabela 3.1:** Primeri bioloških testov določanja hormonov (↓ zmanjšanje, ↑ povečanje)

Hormon	Sistem	Opazovani odgovor
inzulin	glodavci (stradajoči)	↓ krvna glukoza
FSH	nezreli hipofizektomirani glodavci	↑ masa jajčnikovih foliklov
TSH	vsi vretenčarji	↑ sprejemanje J in sproščanje (J)T <sub>4</sub> in (J)T <sub>3</sub>
tiroksin	larve dvoživk	metamorfoza
somatotropin	tibia (podgana)	↑ širina epifizne plošče
okситocin	maternica podgane	↑ krčenje
parathormon	paratireoidektomirana podgana	↑ Ca <sup>2+</sup> v plazmi
estrogeni	kastrirani ali spolno nezreli glodavci	poroženitev nožnice
androgeni	kastrirani ali spolno nezreli glodavci žabje samice	↑ masa prostate inducirana ovulacija
horijski gonadotropini	žabji samci (Galli-Maininijev test) glodavci ali kunci (Ascheim-Zondekov test)	inducirana spermatogeneza nastanek hemoragičnih foliklov in rumenih teles
melanotropin	koža žabe	↑ potemnitev kože
kortikotropin	perfuzija nadledvične žleze	↑ sinteza in sproščanje kortizola

**Določanje hormonov s poskusnimi živalmi** temelji na dajanju preiskovanega materiala poskusnim živalim in opazovanju reakcij živalskega organizma. Te reakcije morajo biti specifične za določen hormon, dobro vidne in merljive. Včasih sta se največ uporabljali metodi za ugotavljanje nosečnosti pri ljudeh, t. i. Galli-Maininijev test (na žabjih samcih) in Ascheim-Zondekov test (na miših), ki pa sta danes opuščena.

- Pri **Galli-Maininijevem testu** se v limfno vrečo na hrbtu žabjega samca injicira urin preiskovane osebe. Po 2 do 4 urah se odvzame vsebino kloake in jo pregleda pod mikroskopom. Veliko število spermijev, ki so se pojavili pod vplivom horijskih gonadotropinov v urinu, pomeni pozitiven rezultat, se pravi nosečnost.

- Pri **Asheim-Zondekovem testu** se spolno nezreli mišji samici v dveh dnevih šestkrat podkožno vbrizga 0,3 ml urina preiskovane osebe. Po treh do štirih dneh se žival usmrti in pregleda njene spolne organe, predvsem maternico in jajčnike. Drobne pikčaste krvavitve na Graafovem foliklu pomenijo pozitiven rezultat. Tudi pri tem testu gre dejansko za reakcijo organizma na horijski gonadotropin v urinu.

**Pri delu z izoliranimi organi** se uporabljajo organi (tkiva), ki odgovarjajo na določen hormon. Po namestitvi na kimograf in primerno urejeni perfuziji organa najprej registriramo kontrakcije po dodatku znanih koncentracij merjenega hormona. Na podlagi teh rezultatov lahko izdelamo umeritveno krivuljo. Prav tako registriramo kontrakcije organa po dajanju preiskovanega materiala in iz umeritvene krivulje nato določimo koncentracijo hormona.

### **B) Fizikalno-kemične metode določanja hormonov**

Fizikalno-kemični postopki omogočajo sicer zelo natančne analize, potrebna pa je ustrezna, navadno precej draga oprema in usposobljeni strokovnjaki za delo z aparati. Najbolj znane metode so spektrofotometrija in nekatere vrste kromatografij (tankoplastna, tekočinska).

- Najbolj znana metoda **tekočinske kromatografije** je **HPLC (*high pressure liquid chromatography*)**. Pri tej metodi se uporabljajo posebne kolone (cevke, polnjene z drobnimi delci), v katerih pride do ločevanja molekul iz testnega vzorca, ki ga apliciramo v kolono, na osnovi njihovega naboja, polarnosti ali različne adsorpcije na nosilec. Kolona je povezana z detektorjem, ki meri absorbanco UV ali vidne svetlobe, fluorescenco, lom svetlobe, prevodnost, radioaktivnost ali molekulsko maso, na osnovi česar lahko molekule identificiramo.
- **Plinska kromatografija** temelji na ločevanju molekul z absorpcijo ali razporejanjem na osnovi njihove hlapnosti. Za identifikacijo molekul se uporabljajo detektorji plamenske ionizacije in toplotne prevodnosti.
- Z metodo **masne spektrometrije** lahko identificiramo molekulsko maso, strukturo in položaj funkcionalnih skupin na osnovi njihove predhodne ionizacije. Masni spektrometer lahko povežemo s plinskim kromatografom (GC-MS) ali HPLC (HPLC-MS).
- **Elektroforeza** se uporablja predvsem za ločevanje beljakovin na osnovi njihovega naboja ali relativne molekulske mase. Po ločevanju se jih lahko prikaže s posebnimi obarvanji. Beljakovine se lahko veže tudi na posebne membrane in označi s specifičnimi protitelesi (npr. *Western blotting*).

### **C) Imunološke metode določanja hormonov**

To so analitske metode, ki temeljijo na specifični imunski reakciji med antigeni in protitelesi. Uporabljajo se za analizo različnih bioloških vzorcev (kri, serum, plazma, urin, slina, mleko itd.) zaradi velike selektivnosti, nizke meje detekcije, možnosti ugotavljanja številnih analitov in direktnih meritev.

- V šestdesetih letih prejšnjega stoletja je bila za določanje hormonov vpeljana analitska metoda, ki združuje specifičnost reakcije antigen-protitelo in občutljivost detekcije radioaktivnosti (1959 – inzulin). Metodo so imenovali **Radio Immuno Assay** ali skrajšano **RIA**. Ta metoda je omogočila natančno določanje koncentracije hormonov do vrednosti  $\mu\text{mol/L}$  in

nmol/L. Kasneje so uvedli še sorodno metodo, imenovano **Immuno Radiometric Assay** ali **IRMA**. S to metodo pa je bilo omogočeno določanje koncentracij do pmol/L. Pri metodi RIA se srečujemo z nekaterimi slabostmi, vezanimi na uporabo radioizotopov, npr. omejen rok trajanja komponent, relativno drag merilni sistem, ustrezno izobraženo in dobro izurjeno osebje, posebna laboratorijska oprema in problem radioaktivnih odpadkov.

- V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so zato poleg radioloških metod pričeli uporabljati tudi metode, pri katerih so uporabili encimski postopek. Imenovali so jih **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)** ali **EIA (Enzyme Immuno Assay)**. Analitska oprema za EIA se lahko uporablja za različne diagnostične metode v imunologiji (diagnostika povzročiteljev bolezni na osnovi ugotavljanja antigenov ali protiteles), farmakologiji (analiza zdravil in drog) in endokrinologiji (določanje koncentracije hormonov).
- Poleg tega so uvedli tudi metodo, ki temelji na fluorescenci, poznano kot **FIA (Fluorescence Immuno Assay)**. V zadnjem času za določanje hormonov razvijajo in uvajajo metode, ki temeljijo na kemiluminiscenci (**Chemiluminiscence immunoassay (CIA)**) in na elektrokemični aktivnosti (**Electrochemical immunoassay**).

Imunološke metode določanja koncentracij snovi temeljijo na treh osnovnih principih: biološkem, fizikalno-kemičnem in detekciji.

- Osnovni **biološki princip** je vezava antigena in protitelesa.
- **Fizikalno-kemični princip** je kompetitivni antagonizem.
- **Princip detekcije** temelji na merjenju radioaktivnosti, adsorbance, fluorescence kemiluminiscence itd.

Za izvedbo vseh imunoloških metod določanja hormonov (ali drugih snovi) potrebujemo kemično čisti hormon, protitelesa proti temu hormonu in označen hormon (npr. z izotopi, encimi, itd.), identičen tistemu, ki ga želimo določiti.

### **Izolacija in sinteza hormonov**

Pri endokrinoloških poskusih ali merjenju koncentracij hormonov v telesnih tekočinah potrebujemo kemično čiste hormone. Ti so potrebni za pripravo protiteles in kalibratorjev (standardov) ter za označevanje slednikov. V preteklosti so kot vir hormonov uporabljali ekstrakte tkiv, ki so vsebovali mešanico hormonov in drugih snovi. Kasneje so razvili metode čiščenja hormonov iz tkivnih ekstraktov. Določitev strukture hormonov je omogočila tudi njihovo kemično sintezo. Številne hormone, predvsem steroide, pa pridobivajo iz nekaterih gliv (npr. *Aspergillus*). Danes poteka komercialna proizvodnja večine naravnih pa tudi številnih sintetičnih hormonov.

### **Priprava protiteles**

Za določanje koncentracij snovi z imunološkimi metodami potrebujemo specifična protitelesa za antigene, t. j. za snovi, ki jih določamo v telesni tekočini. Pri imunološki metodi določanja hormonov ima vlogo antigena tisti hormon, katerega koncentracijo želimo določiti.

Priprava protiteles proti hormonom temelji na imunskih metodah. Kemično čisto snov (antigen) z ustreznim postopkom apliciramo poskusnim živalim (kuncem, ovcam, oslom, govedu), ki začnejo

proizvajati protitelesa proti specifičnemu antigenu. Snovi, ki izzovejo imunski odgovor, mora organizem prepoznati kot tujek, zato morajo biti zadosti velike in imeti kompleksno zgradbo.

Polipeptidni hormoni lahko zaradi svoje velikosti, strukture in medvrstnih razlik delujejo kot antigeni, zato pri prejemniku sprožijo imunski odgovor (proizvajanje ustreznih protiteles). Molekule steroidnih ali jod vsebujočih ščitničnih hormonov so majhne in enake pri vseh vrstah živali, zato pri prejemniku sprožijo le biološki odgovor, ne pa imunskega. Zato je te antigene (haptene) pred imunizacijo potrebno vezati na beljakovinske komponente, da se sproži imunski odgovor prejemnika. Na tak način je teoretično možno pripraviti protitelesa za katerikoli hormon.

Protitelesa, proizvedena *in vivo*, so poliklonalna, ker jih proizvaja več klonov B limfocitov. S postopki *in vitro* je mogoče proizvajati monoklonalna protitelesa, ki izvirajo le iz enega klona B limfocitov. S tem močno povečamo specifičnost protiteles, saj monoklonska protitelesa prepoznavajo le določen haptent.

### Označevanje (markiranje) antigena

To je postopek vezave radioizotopa ali druge snovi na antigen, enak tistemu, ki ga določamo.

**Pri radioimunskem postopku (RIA)** za označevanje antigenov uporabljamo radioaktivne izotope, največ  $^{125}\text{J}$ ,  $^{131}\text{J}$  in  $^{57}\text{Co}$  (gama sevalci) ter  $^3\text{H}$  in  $^{14}\text{C}$  (beta sevalca). Glede na to uporabljamo detekcijske sisteme za gama ali beta sevanje. Z radioaktivnim izotopom označeni hormon v praksi imenujemo slednik (**tracer**). V praksi se največ uporablja  $^{125}\text{J}$ . Njegova prednost je v relativno kratki, 60-dnevni razpolovni dobi. Ta omogoča na eni strani zadovoljivo dolgo dobo skladiščenja označenega antigena, po drugi strani pa je dovolj kratka, da se majhne količine tega izotopa v času desetih razpolovnih dob popolnoma razgradijo in se njegova radioaktivnost zmanjša na radioaktivnost okolja.

**Pri encimsko-immunski metodi (EIA)** za označevanje antigenov uporabljamo encime, ki sprožijo določen katalitični proces. Z encimom označeni hormon v praksi imenujemo konjugat. V ta namen se največ uporabljata alkalna fosfataza (AP) in hrenova peroksidaza (HP). Ob encimski reakciji nastajajo snovi, ki reagirajo s t. i. kromogenom, da nastane ustrezna barvna reakcija. S primerno aparaturo registriramo absorbanco v standardih in vzorcih.

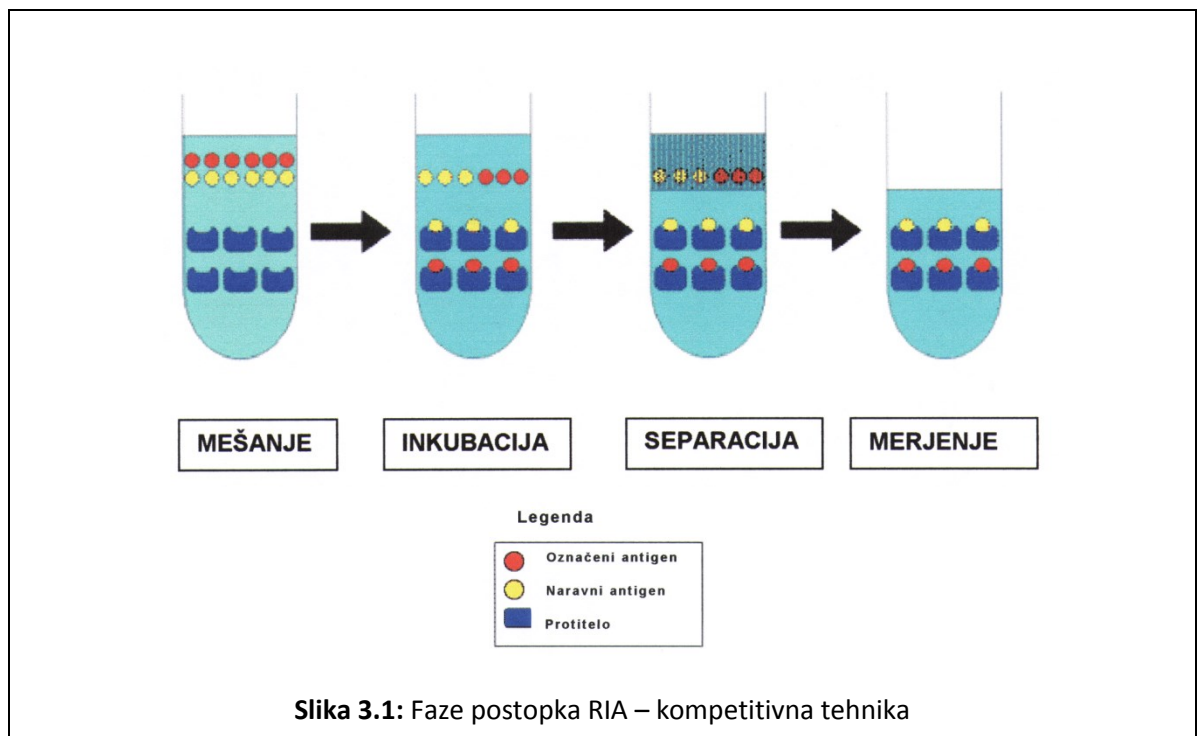
### Izvedba imunoloških postopkov

Imunološki postopki se večinoma uporabljajo za merjenje ravni hormonov v plazmi, drugih telesnih tekočinah ali tkivnih ekstraktih. Testi za določanje hormonov morajo ustrezati številnim, strogo določenim kriterijem, ki zagotavljajo ponovljivost in primerljivost meritev. Te ovrednotimo s postopkom validacije testa. Teste za določanje hormonov lahko pripravimo v laboratoriju, vendar je postopek zelo zapleten, zamuden in drag. Zato se v praksi večinoma uporablja tovarniško pripravljene teste, ki vsebujejo vse komponente, potrebne za izvedbo postopka meritve.

Tehnike imunoloških postopkov delimo na **kompetitivne** in **nekompetitivne**. S kompetitivnimi metodami je mogoče ugotavljati protitelesa, lahko pa tudi antigene. Od nekompetitivnih metod pa se največ uporabljata indirektna metoda za ugotavljanje protiteles in sendvič metoda za ugotavljanje antigenov. V nadaljevanju opisana postopka sodita med kompetitivne teste, ki se uporabljajo za določanje hormonov.

**Izvedba reakcij**

- **Postopek RIA** izvajamo v seriji epruvet. Njihovo število je odvisno od števila kalibratorjev in vzorcev, vse meritve pa delamo v dvojniku. Postopek (slika 3.1) pričnemo tako, da v vsako epruveto dodamo znano količino testne tekočine oziroma kalibratorja. Nato dodamo označeni antigen in protitelesa, oboje v znanih količinah in koncentracijah. Vsebinsko epruvet dobro premešamo. Sledi inkubacija, v kateri steče vezava antigenov in protiteles. Čas inkubacije lahko traja od ene pa vse do štiriindvajsetih ur. Dolge inkubacije zahtevajo nizke temperature, pri hitrih (kratkih) inkubacijah pa je temperatura običajno okoli 37 °C. Med inkubacijo se tako označeni hormon (antigen) kot naravni, neoznačeni hormon vežeta na omejeno in konstantno količino protiteles. Pri tem med obema prihaja do t. i. **kompetitivnega antagonizma**: če je na razpolago več označenega kot naravnega antigena, se bo vezalo več označenega, če pa je več naravnega kot označenega antigena, se bo vezalo več naravnega. Nato nastopi faza ločevanja vezanih in nevezanih komponent. Pri tem ohranimo v epruveti samo tiste antigene, ki so se vezali s protitelesi, nevezane antigene, tako naravne kot označene, pa odstranimo, da ne motijo meritve. V ta namen je na razpolago več načinov, ki jih uporabljamo glede na vrsto hormona, ki ga določamo. Najobičajnejše metode so ločitev z aktivnim ogljem, precipitacija, vezava s sekundarnimi protitelesi in vezava protiteles na stene epruvete (ta, sodobnejši postopek se imenuje *coated tubes*).



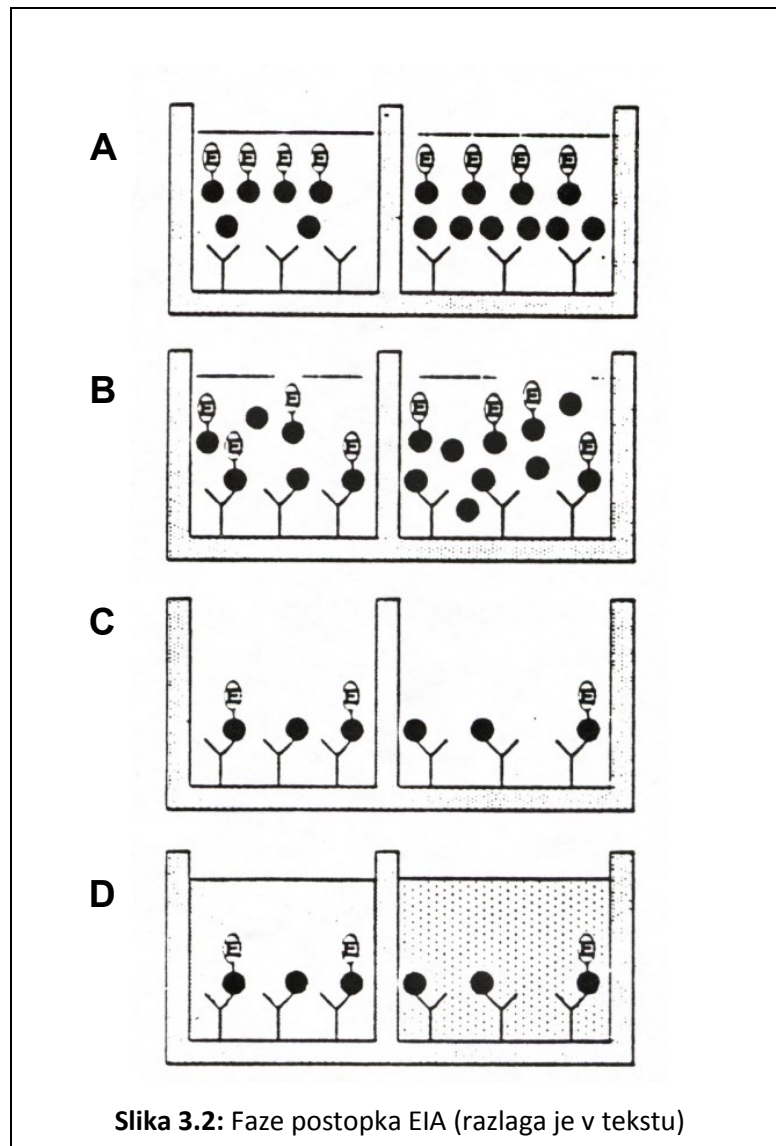
- **Pri postopku EIA** gre v osnovi za podoben princip kot pri RIA, le da antigene namesto z izotopom označimo z encimom, katerega aktivnost merimo glede na njegovo delovanje na specifičen substrat. Postopki se izvajajo na posebnih mikrotitrskih ploščah (MTP) s 96 (8 × 12) jamicami. Stopnje vsake metode EIA so vezava (adsorbcija) antigena ali protitelesa na trdno fazo (na steno jamice MTP), dodajanje preiskovanega vzorca in z encimom označenih antigenov (slika 3.2 (A)), inkubacija (slika 3.2 (B)), izpiranje (slika 3.2 (C)) in dodajanje substrata za encim (slika 3.2 (D)). Da se ta ne razgradi v celoti, encimsko reakcijo po določenem času

ustavimo z dodajanjem raztopine za ustavljanje reakcije (najpogosteje 0,1 do 0,2 M raztopina žveplene kisline), kar povzroči nastanek različno intenzivnih obarvanj vsebine jamic.

**Izvedba meritev**

**Pri RIA** določamo radioaktivnost s t. i. števci. Kadar delamo z beta sevalci, uporabljamo beta, kadar delamo z gama sevalci, pa gama števce. Obe vrsti števecov delujeta na principu t. i. scintilacije. To pomeni, da radioaktivno sevanje izzove v delu števca, imenovanem kristal, proces scintilacije (svetlikanja), ki nastane zaradi učinka radioaktivnega sevanja na kristal NaJ (gama sevanje) ali tekoči kristal (beta sevanje). Fotone, ki nastanejo pri tej interakciji, registrira fotopomnoževalka in jih preko ustreznega elektronskega vezja ojača. Števci dajo podatke o radioaktivnosti vzorca v enotah **CPM (Counts Per Minute)**, to je v številu radioaktivnih razpadov v minuti.

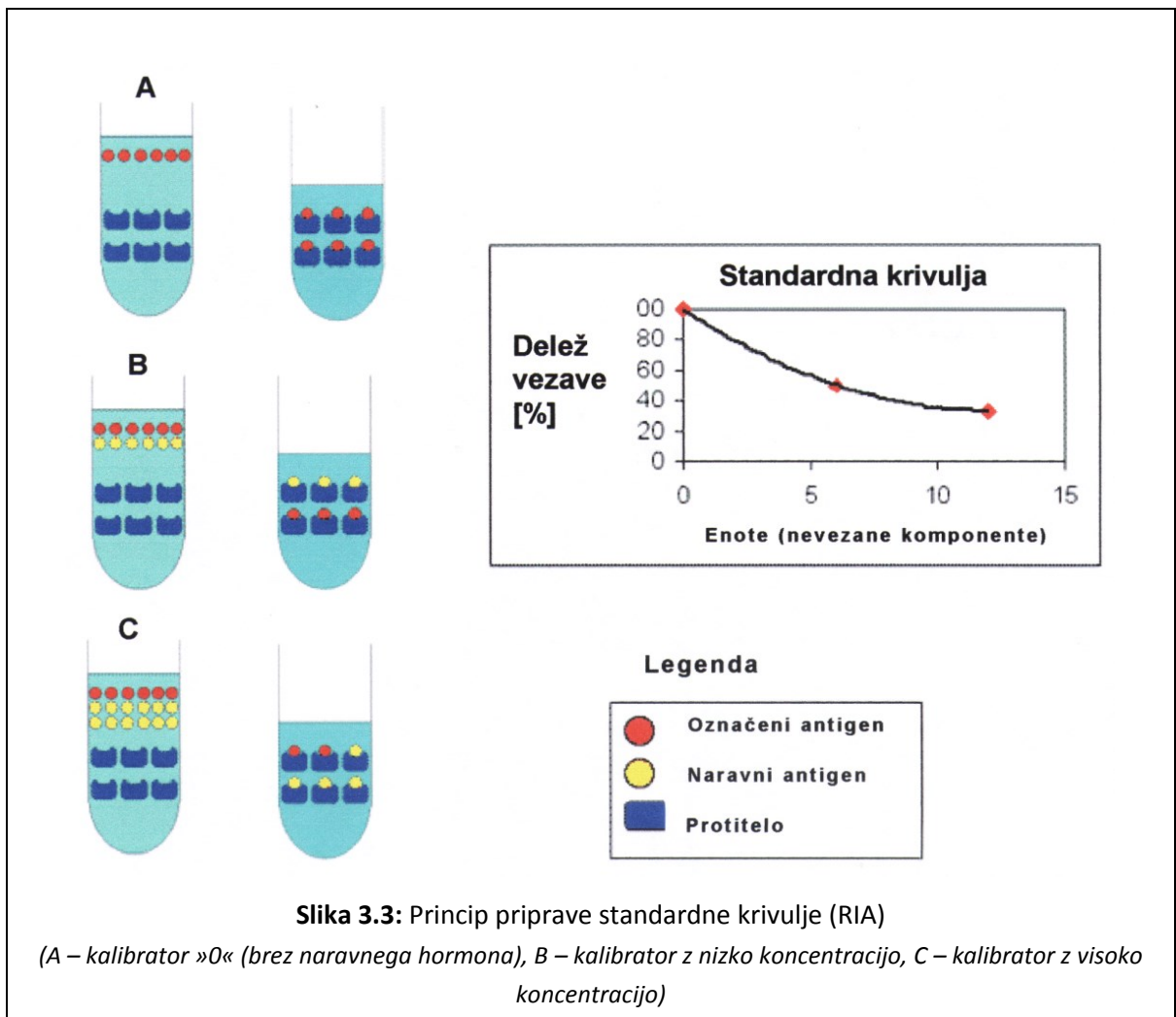
**Pri EIA** rezultate reakcij lahko odčitamo kvantitativno. V tem primeru s spektrofotometrom izmerimo optične gostote (**absorbance**) standardov in vzorcev, kvalitativne meritve pa izvedemo na osnovi opazovanja spremembe barve vsebine jamic.



**Izračun rezultatov**

Pri vseh vrstah imunoloških metod moramo za izračun rezultatov izdelati **umeritveno (standardno) krivuljo**. Pripravimo jo s pomočjo **standardnih vzorcev (kalibratorjev)**. To so raztopine hormonov (antigenov) s točno določenimi koncentracijami, pripravljene laboratorijsko ali tovarniško. Z vsakim standardnim vzorcem naredimo kompletno meritev in pri RIA določimo njegovo radioaktivnost (CPM), pri EIA pa absorbanco. Pri metodah, ki temeljijo na kompetitivnem antagonizmu, je med koncentracijo preiskovanega hormona in radioaktivnostjo oziroma absorbanco vzorca obratno sorazmerje, kar pomeni, da bomo največjo vrednost izmerili v kalibratorju z najmanjšo koncentracijo preiskovanega hormona, z naraščanjem koncentracij hormona v kalibratorjih pa bo vrednost upadala (slika 3.3).

Standardno krivuljo narišemo na logaritemskem papirju, kjer na ordinato z logaritemsko skalo nanesemo vrednosti CPM (RIA) oziroma absorbance (EIA), na absciso z decimalno skalo pa vrednosti koncentracije. Rezultate meritev CPM oz. absorbance kalibratorjev nanesemo nad točkami koncentracije, točke med seboj povežemo in dobimo standardno krivuljo. Pri meritvi koncentracije preiskovanega vzorca rezultat meritve nanesemo na ordinato; od te točke potegnemo vodoravno črto do standardne krivulje. Od točke, kjer horizontala seka krivuljo, potegnemo navpičnico do abscise. Na mestu, kjer ta seka absciso, preberemo vrednost koncentracije izmerjenega vzorca.





Postopek določanja koncentracije z zgoraj opisano metodo je zamuden in dokaj nenatančen. Sodobni števeci so navadno povezani z računalniki. Ustrezni računalniški programi omogočajo avtomatično, hitro in natančno izračunavanje rezultatov, vendar pa vsi kot osnovo potrebujejo meritve kalibratorjev z znanimi koncentracijami hormonov.

### **Č) Merjenje koncentracije progesterona z EIA**

V praksi so na voljo številni komercialni kompleti za določanje progesterona, ki omogočajo enostavno, zanesljivo in natančno merjenje tega hormona v krvni plazmi ali serumu samic domačih živali za ugotavljanje pojatve ali brejosti oziroma ocenjevanje stanja rumenega telesa.

Test Ovucheck temelji na kompetitivnem antagonizmu med neoznačenim (naravnim) progesteronom v vzorcu ali standardu in z encimom alkalno fosfatazo označenim progesteronom pri vezavi na omejeno število specifičnih protiteles proti progesteronu.

Jamice MTP so prekrivane s protitelesi, na katera se veže progesteron. Po inkubaciji se vse komponente razen vezanih odstranijo z izpiranjem. Količina vezanega označenega progesterona v jamicah je obratno sorazmerna koncentraciji neoznačenega progesterona, ki se nahaja v vzorcu in se izmeri po reakciji alkalne fosfataze z njenim substratom ob koncu druge inkubacije. Barva, ki pri tem nastane, se meri spektrofotometrično, koncentracija progesterona v vzorcu pa se določi po standardni krivulji.

#### **a) Material:**

200  $\mu\text{L}$  multipipeta, 100  $\mu\text{L}$  multipipeta, 10  $\mu\text{L}$  pipeta, čitalec mikrotitrskih plošč (spektrofotometer), komercialni test za določanje progesterona.

#### **b) Postopek:**

Test izvedemo po originalnih navodilih proizvajalca, ki so priložena kompletu.

#### **c) Rezultati:**

Iz absorbanc standardov skonstruiramo standardno krivuljo. Iz te krivulje odčitamo koncentracije progesterona v preiskovanih vzorcih.

#### **č) Naloge:**

- Iz navodil testa preprišite vse komponente in razložite njihov namen oziroma uporabo!
- Določite koncentracije progesterona v vzorcih krvnega seruma samic domačih živali!

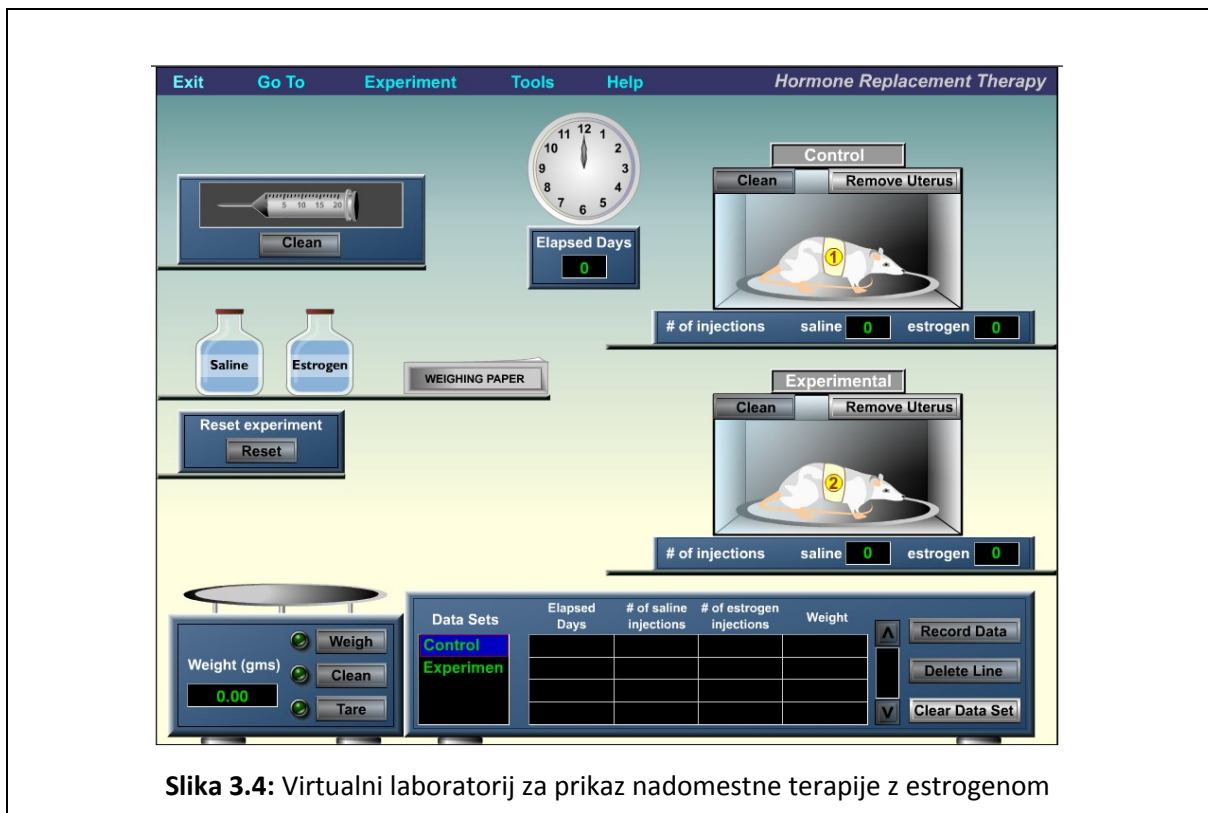
## 3.2 PRIKAZ DELOVANJA HORMONOV

Hormonalni sistem ima številne kompleksne in zapletene učinke na telo kot celoto in tudi na specifična tkiva in organe. Proučevanje učinkov hormonov na organizem je v laboratoriju tehnično težko izvedljivo, saj poskusi lahko trajajo več dni, tednov ali celo mesecev in so zelo dragi. Poleg tega je poskusne živali pogosto treba žrtvovati, včasih pa so za izvedbo poskusov potrebni tehnično zapleteni kirurški posegi. Računalniške simulacije (npr. PhysioEx) omogočajo prikaz delovanja nekaterih hormonov na organizem z uporabo virtualnih živali namesto resničnih. Zapletene kirurške posege lahko izvedemo s pritiskom na miško in celotne poskuse v delčku časa, ki bi ga potrebovali pri resničnih poskusih.

### 3.2.1 Delovanje estrogenov na maternico podgane

Folikli v jajčnikih samic med razvojem proizvajajo estrogene hormone, ki vplivajo na rast in razvoj ženskih spolnih organov. V maternici tudi pospešujejo razvoj sluznice ter njeno pripravo na sprejem zarodka. S kirurško odstranitvijo jajčnikov (*ovarietomija*) pri poskusnih živalih odstranimo vir estrogenih hormonov in povzročimo atrofijo maternice.

Simulacija prikazuje klasičen endokrinološki poskus, s katerim prikažemo učinek estrogenih hormonov na maternico. Poskus se izvaja na dveh ovariektomiziranih podganah ženskega spola, ki zato ne proizvajata estrogena. Eni podgani z dnevnimi injekcijami estrogen nadomeščamo, druga pa služi kot kontrola in vsakodnevno prejema injekcije fiziološke raztopine. V nadaljevanju poskusa obema podganama odstranimo maternico. Izolirana organa stehamo in na osnovi mase sklepamo o učinkih estrogena.



Slika 3.4: Virtualni laboratorij za prikaz nadomestne terapije z estrogenom

Iz menija poskusa izberemo poglavje **Hormonska nadomestna terapija (*Hormone replacement therapy*)**. V virtualnem laboratoriju (slika 3.4) sta dve podgani, na katerih bomo izvedli poskus, steklenički s fiziološko raztopino in raztopino estrogena, injekcijska brizga, škatlica s tehtalnim papirjem in tehtnica. Po odstranitvi maternice podgana izgine z ekrana in je ne moremo vrniti, razen če ponovno začnemo s poskusom. To ponazarja situacijo pri delu z živimi živalmi, ko po odstranitvi maternice (*histerektomiji*) žival žrtvujemo.

#### a) Postopek:

1. Injekcijsko brizgo premaknemo v stekleničko s fiziološko raztopino. Brizga se avtomatsko napolni z 1 ml raztopine.
2. Injekcijsko brizgo premaknemo v kletko s kontrolno podgano. Raztopina se vbrizga v spodnje abdominalno področje (intraperitonealno). Po aplikaciji se brizga avtomatsko vrne v ležišče. Očistimo jo z ukazom **Clean**.
3. Injekcijsko brizgo premaknemo v stekleničko z raztopino estrogena. Brizga se avtomatsko napolni z 1 ml raztopine.
4. Postopek, opisan v 2. točki, ponovimo še s poskusno podgano. Po končani aplikaciji z računalniško miško poženemo uro.
5. Postopek, opisan v točkah 1. do 4. ponavljamo, dokler vsaka podgana v času 7 dni ne dobi 7 injekcij fiziološke raztopine oziroma raztopine estrogena. Število prejetih injekcij je prikazano pod kletkama (1 injekcijo dnevno).
6. Izberemo škatlico s tehtalnim papirjem (**Weighting Paper**). Prikaže se majhen košček tehtalnega papirja, ki ga premaknemo na tehtnico. Ta nam pokaže maso papirja. Z ukazom **Tare** uravnamo (*tariramo*) tehtnico, tako da je na njeni skali prikazana masa 0.00.
7. Z izbiro ukaza **Odstrani maternico (*Remove Uterus*)** obema podganama odstranimo maternico (podgani izgineta, v kletkah ostaneta maternici).
8. Maternico kontrolne podgane premaknemo na tehtnico. Z izbiro ukaza **Weight** stehtamo organ in zapišemo podatke (**Record Data**).
9. Z ukazom **Clean** odstranimo maternico in papir s tehtnice.
10. Ponovimo postopek, opisan v 6. točki.
11. Po postopku, opisanem v 8. točki, stehtamo maternico poskusne podgane in zapišemo podatke (**Record Data**).

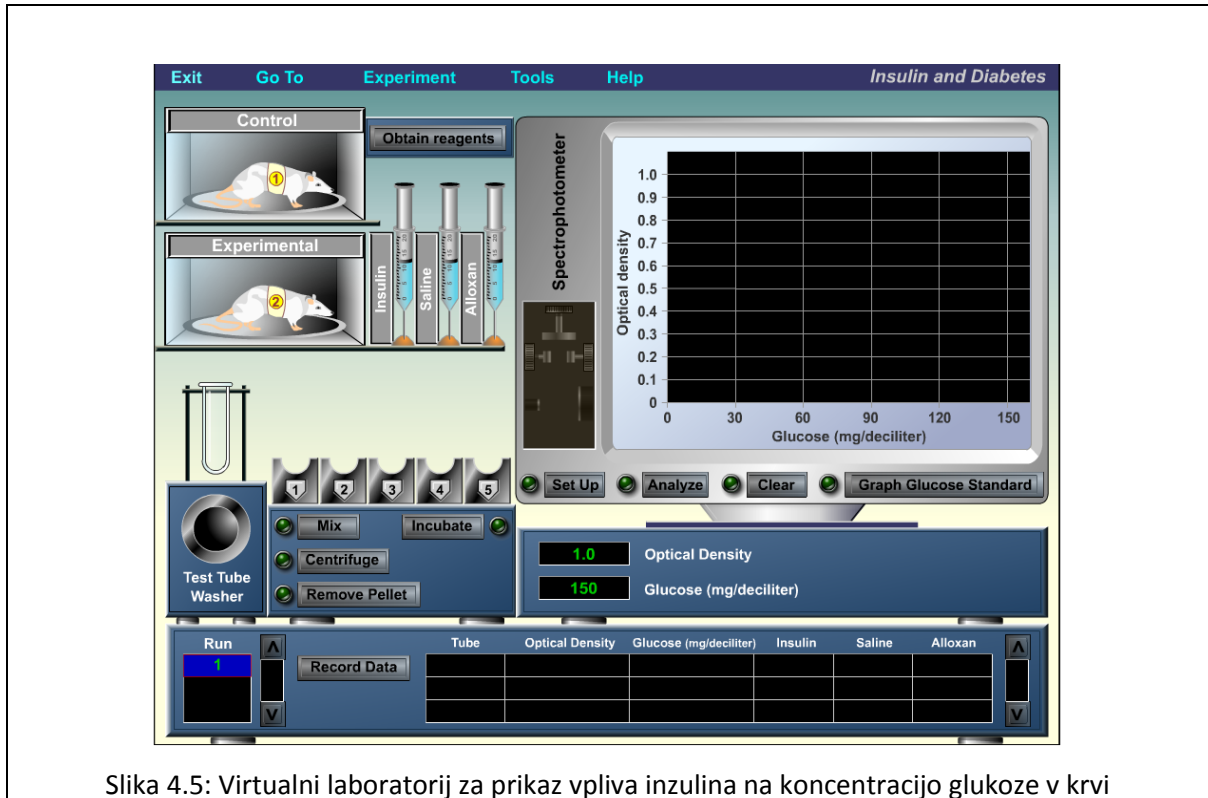
#### b) Naloge:

Odgovorite na spodnja vprašanja:

- Kakšna je bila razlika med maternico poskusne in kontrolne podgane?
- Kako estrogeni hormoni vplivajo na poskusno žival?
- Kaj bi se zgodilo, če bi namesto estrogenih hormonov aplicirali testosteron?

### 3.2.2 Inzulin in diabetes

Inzulin nastaja v  $\beta$  celicah endokrinega dela trebušne slinavke. Ima pomembno vlogo pri uravnavanju koncentracije glukoze v krvi, saj celicam omogoča, da sprejemajo glukozo iz krvnega obtoka. Kadar je nastajanje inzulina v pankreasu onemogočeno, nastane sladkorna bolezen (diabetes melitus tipa I). Sladkorna bolezen lahko nastane tudi ob normalnem nastajanju inzulina, če organizem nanj ne odgovarja (diabetes melitus tipa II). V obeh primerih glukozo ostaja v krvi, ker je telesne celice ne morejo izkoriščati.



Slika 4.5: Virtualni laboratorij za prikaz vpliva inzulina na koncentracijo glukoze v krvi

V poskusu bomo proučevali učinke inzulina na diabetes tipa I. Poskus je razdeljen v dva dela: v prvem bomo pripravili standardno krivuljo za glukozo, v drugem pa bomo primerjali zdravo in diabetično podgano in vplive inzulina na obe.

#### **1. del: priprava standardne krivulje za glukozo**

Da lahko izmerimo koncentracijo glukoze v krvi (2. del poskusa), moramo najprej pripraviti standardno krivuljo glukoze. Poskus začnemo z izbiro poglavja **Inzulin in diabetes 1. del (Insulin and Diabetes-Part 1)** iz menija poskusa. Na desni strani ekrana je spektrofotometer, na levi pa inkubacijska enota in raztopine, ki jih potrebujemo za določanje koncentracij glukoze. Za pripravo standardne krivulje glukoze potrebujemo 5 epruвет z znanimi koncentracijami glukoze (30 mg/dl, 60 mg/dl, 90 mg/dl, 120 mg/dl in 150 mg/dl), ki jim s spektrofotometrom izmerimo optično gostoto.

#### **a) Postopek:**

V stojalo inkubacijske enote postavimo 5 epruвет.

1. Kapalko iz stekleničke s prvim standardom premaknemo nad 1. epruветo. Iz kapalke kane kapljica raztopine. Postopek ponovimo še z ostalimi epruветami (v vsako naslednjo kane 1 kapljica več).

2. Kapalko iz stekleničke z destilirano vodo (**Deionized water**) premaknemo nad 1. epruveto. Iz kapalke kanejo 4 kapljice. Postopek ponovimo še z ostalimi epruvetami (v vsako naslednjo kane 1 kapljica manj, v zadnjo nobena).
3. Z ukazom **Mix** premešamo vsebino epruвет.
4. Z ukazom **Centrifuge** centrifugiramo epruvete (ob tem se za nekaj trenutkov potopijo v inkubacijsko enoto).
5. Ko se epruvete dvignejo, z ukazom **Remove Pellet** odstranimo iz epruвет usedlino.
6. Kapalko iz stekleničke z encimskim barvnim reagentom (**Enzyme color reagent**) premaknemo nad 1. epruveto. Iz kapalke kane 5 kapljic reagenta. Ta vsebino epruветe obarva vijolično. Postopek ponovimo še z ostalimi 4 epruветami.
7. Izberemo ukaz **Incubate**. Epruvete se potopijo v inkubacijsko enoto, inkubirajo in nato spet dvignejo.
8. Na spektrofotometru izberemo ukaz **Set Up**. Instrument se ogreje in pripravi na meritve.
9. Prvo epruveto premaknemo v spektrofotometer in izberemo ukaz **Analyze**. Na ekranu se pojavi rdeča pika, ob prikazih optične gostote in koncentracije glukoze (mg/dl) pa ustrezni vrednosti. Z ukazom **Record Data** shranimo rezultate, epruveto pa umaknemo v pomivalni stroj. Postopek ponovimo še z ostalimi 4 epruветami.

**b) Naloge:**

1. Rezultate vnesite v tabelo!
2. Iz podatkov narišite standardno krivuljo za glukozo (abscisa – koncentracija glukoze [mg/100 ml], ordinata – optična gostota raztopin)!

**Standardna krivulja glukoze**

Številka epruветe					
Koncentracija glukoze [mg/100 ml]					
Optična gostota					

**2. del: primerjava koncentracije glukoze pred injekcijo inzulina in po njej**

Poskus začnemo z izbiro poglavja **Inzulin in diabetes 2. del (Insulin and Diabetes-Part 2)** iz menija poskusa. Virtualni laboratorij (slika 3.5) je podoben kot pri prejšnjem poskusu, le da sta v zgornjem levem vogalu kletki s podganama, desno od njiju pa so injekcijske brizge z inzulinom, fiziološko raztopino in aloksanom. Aloksan je snov, ki selektivno uničuje  $\beta$  celice pankreasa, zato povzroča nastanek diabetesa.

**a) Postopek:**

1. Injekcijsko brizgo s fiziološko raztopino premaknemo v kletko s kontrolno podgano in ji apliciramo substanco.
2. Injekcijsko brizgo z aloksanom premaknemo v kletko s poskusno podgano in ji apliciramo substanco.
3. Epruveto premaknemo v kletko s kontrolno podgano. Vanjo kanejo tri kapljice krvi iz repa. Epruveto namestimo na prvo pozicijo stojala inkubacijske enote.
4. Drugo epruveto premaknemo v kletko s poskusno podgano. Tudi vanjo kanejo tri kapljice krvi iz repa. Epruveto namestimo na drugo pozicijo stojala inkubacijske enote.
5. Obema podganama apliciramo inzulin.
6. Obema podganama odvzamemo kri in epruveti postavimo na 3. in 4. pozicijo inkubacijske enote.
7. Izberemo ukaz **Obtain Reagents**. Kletki s podganama in injekcijske brizge izginejo z zaslona, namesto njih pa se prikaže polica z destilirano vodo in reagenti (barijev hidroksid, encimski barvni reagent in heparin).
8. Kapalko iz stekleničke z destilirano vodo premaknemo nad 1. epruveto. Vanjo pade 5 kapljic. Postopek ponovimo še z ostalimi epruvetami.
9. Kapalko iz stekleničke z barijevim hidroksidom (uporablja se za odstranjevanje beljakovin in celic) premaknemo nad 1. epruveto. Vanjo pade 5 kapljic. Postopek ponovimo še z ostalimi epruvetami.
10. Kapalko iz stekleničke s heparinom premaknemo nad 1. epruveto. Vanjo pade 1 kapljica. Postopek ponovimo še z ostalimi epruvetami.
11. Z ukazom **Mix** premešamo vsebino epruвет.
12. Z ukazom **Centrifuge** epruvete centrifugiramo (ob tem se za nekaj trenutkov potopijo v inkubacijsko enoto).
13. Ko se epruvete dvignejo, z ukazom **Remove Pellet** odstranimo usedlino iz epruвет.
14. Kapalko iz stekleničke z barvnim reagentom premaknemo nad 1. epruveto. Iz kapalke pade 5 kapljic reagenta, ki vsebino epruветe obarva vijolično. Postopek ponovimo še z ostalimi epruветami.
15. Izberemo ukaz **Incubate**. Epruvete se potopijo v inkubacijsko enoto, inkubirajo in nato dvignejo.
16. Na spektrofotometru izberemo ukaz **Set Up**. Instrument se ogreje in pripravi na meritve.
17. Izberemo ukaz **Graph Glucose Standard** pod ekranom spektrofotometra, kjer se izriše standardna krivulja, ki smo jo pripravili pri prejšnjem poskusu.
18. Prvo epruveto premaknemo v spektrofotometer in izberemo ukaz **Analyze**. Na ekranu se pojavi vodoravna črta, ob prikazu optične gostote pa ustrezna vrednost. Rdečo navpično črto z desnega roba ekrana premaknemo do točke, kjer vodoravna črta seka standardno krivuljo. Na prikazu koncentracije glukoze vidimo ustrezno vrednost.
19. Epruveto premaknemo v pomivalni stroj in shranimo rezultate (**Record Data**).
20. Meritev ponovimo še z ostalimi epruветami.

Številka epruvete				
Opis vzorca				
Optična gostota				
Koncentracija glukoze [mg/100 ml]				

**b) Naloge:**

1. Izmerjene vrednosti optične gostote vnesite v tabelo!
2. Po standardni krivulji, ki ste jo pripravili v 1. delu poskusa, določite koncentracijo glukoze v testnih vzorcih. Rezultate vnesite v tabelo!
3. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Razložite, kako in zakaj se koncentracija glukoze v 1. epruveti razlikuje od tiste v 2.!
  - Kakšno stanje povzroči v organizmu aloksan?
  - Kakšna je koncentracija glukoze v 3. epruveti v primerjavi s 1.? Razložite rezultat!
  - Kakšna je koncentracija glukoze v 4. epruveti v primerjavi z 2.? Razložite rezultat!
  - Kako je inzulin učinkoval na kontrolno podgano?
  - Kako je insulin učinkoval na poskusno podgano?

## 4 FIZIOLOGIJA PREBAVE

Jemanju hrane sledijo kemični in fizikalni procesi prebave, ki razgradijo hranilne snovi, tako da se njihove strukturne enote in druge enostavne kemične snovi lahko absorbirajo in vstopijo v procese intermediarnega metabolizma. Pri vseh vrstah domačih živalih so prebavila sestavljena iz prebavnega trakta (usta, požiralnik, želodec in črevo) in akcesornih prebavnih organov (slinske žleze, trebušna slinavka, jetra), vendar v velikosti in vlogi posameznih delov prebavil obstajajo precejšnje medvrstne razlike zaradi razlik v prehrani.

### 4.1 PREBAVA V USTIH

Usta so najbolj kranialni del prebavil, ki omogočajo sprejemanje hrane in zmanjševanje velikosti zaužitih delcev ob žvečenju. Ob tem se hrana premeša s slino, kar olajša požiranje zaužite hrane (bolus). Pri nekaterih živalskih vrstah se v ustih prične tudi encimska razgradnja hranilnih snovi.

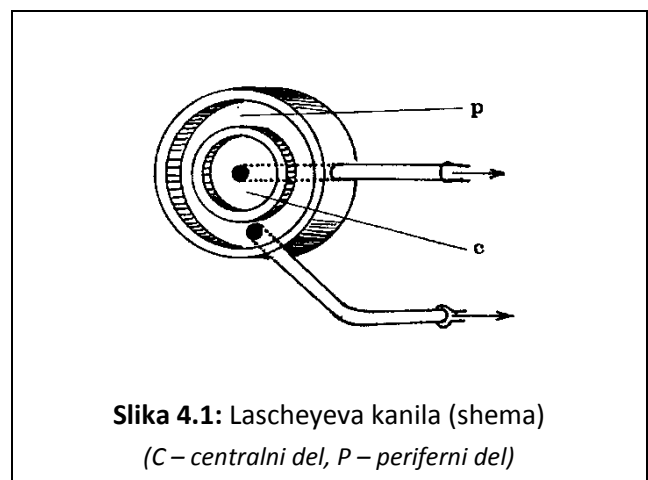
#### 4.1.1 Metode zbiranja sline in proučevanja funkcij slinskih žlez

Za proučevanje biokemičnih in fizioloških lastnosti sline, pogosto pa tudi v klinične namene, potrebujemo določene količine sline, ki jo lahko pridobimo na različne načine.

**Mešano slino** lahko pridobimo pri človeku tako, da poskusna (preiskovana) oseba pljuva slino v zbirno posodico, ob tem pa vzpodbuja izločanje sline z žvečenjem parafina ali gume. Pri živalih lahko mešano slino dobimo neposredno tako, da kosem vate (ali druge vpojne snovi) nekaj časa držimo v ustih živali in ga nato ožmemo. Slinjenje lahko pospešimo z dajanjem nekaterih snovi (gl. vajo 4.1.2).

Za pridobivanje **čiste sline iz ene od glavnih slinskih žlez** lahko uporabimo kateterizacijo izvodila (začasno fistulo) ali Laschejevo kanilo (slika 4.1). Kateterizacijo izvedemo tako, da v izvodilo žleze uvedemo kateter (tanko gumijasto ali plastično cevčico), skozi katero izteka slina v posodo. Živali ta kateter običajno pregriznejo ali kako drugače odstranijo, zato je ta metoda izvedljiva le v narkozi in je manj uporabna.

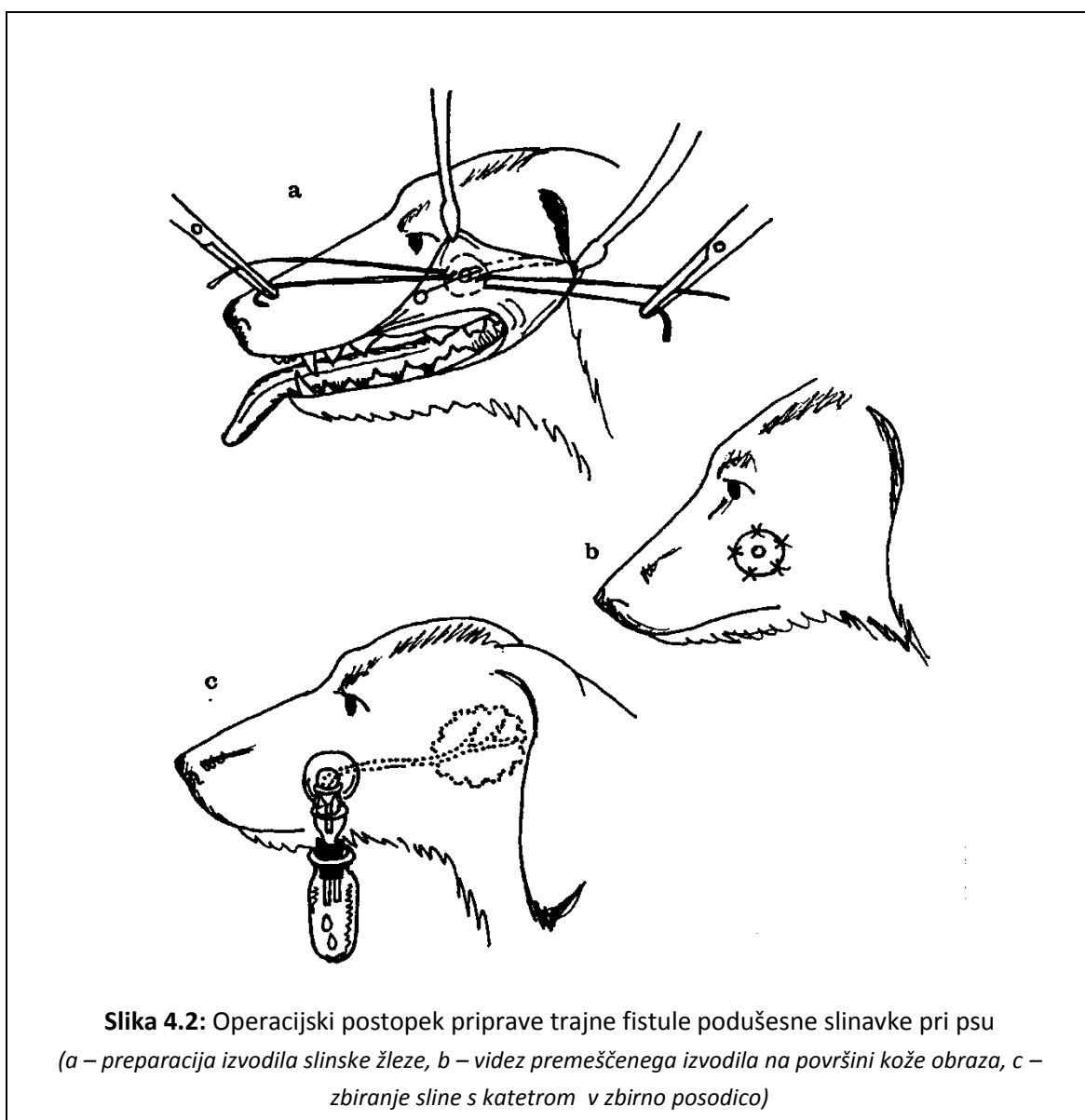
Laschejeva kanila je okrogla, plitva posodica, sestavljena iz dveh koncentričnih delov: centralni del namestimo nad izvodilo slinske žleze, v perifernem delu pa s črpalko ali brizgo ustvarimo vakuum in omogočimo fiksacijo naprave. Centralni del je povezan s cevko, skozi katero s črpalko črpamo slino.



Pri kliničnih raziskavah izločanja sline so v preteklosti uporabljali predvsem pse. Rezultati teh poskusov so veliko prispevali k poznavanju funkcije slinskih žlez in faktorjev, ki vplivajo na



izločanje in sestavo sline. Količino izločene sline pri živalih so določali s pomočjo **požiralnikove (ezofagealne) fistule**. Pri tej metodi prežvečena in pogoltnjena hrana izhaja skozi odprtino v požiralniku. Iz razlike med maso sveže in pogoltnjene hrane lahko izračunamo količino izločene sline. Za dolgotrajnejše proučevanje izločanja sline pri živalih so uporabljali **trajno fistulo** (slika 4.2), pri kateri se izvodilo določene slinske žleze premesti na površino kože obraza. Narkotizirani živali, ki se ji predhodno obrije dlako na ustreznem delu obraza, se odpre usta in poišče ustje izvodila slinske žleze. S krožnim rezom okoli ustja se to oddvoji od okolne sluznice, nato pa se previdno preparira del izvodila. Nato se izvede rez skozi miškulaturo in kožo lica in skozi odprtino potegne preparirano izvodilo, katerega ustje se prišije na kožo obraza. Ko se rana zaceli, se v tako premaknjeno izvodilo vstavi kateter s posodico, v kateri se nabira slina. Pod vplivom delovanja različnih faktorjev, ki vplivajo na količino in sestavo sline, bo skupaj z drugimi slinskimi žlezami funkcionirala tudi žleza z vstavljenim kanilom. Živali s takimi fistulami lahko živijo več let. Problemi lahko nastopijo pri prežvekovalcih, ki jim moramo del sline vračati ali pa dodajati v hrano  $\text{NaHCO}_3$ .



**Slika 4.2:** Operacijski postopek priprave trajne fistule podušesne slinavke pri psu  
(a – preparacija izvodila slinske žleze, b – videz premeščenega izvodila na površini kože obraza, c –  
zbiranje sline s katetrom v zbirno posodico)

### 4.1.2 Stimulacija izločanja sline pri kuncu

Izločanje sline poteka pod vplivom vegetativnega živčnega sistema – simpatikusa in parasimpatikusa. Pri živalih in človeku je možno vplivati na izločanje sline s sprožanjem različnih pogojnih in nepogojnih refleksov (posledica mehničnega, kemičnega in drugega draženja receptorjev v ustni sluznici, opazovanje, vonjanje hrane), z draženjem živčnih vlaken, ki vstopajo v slinsko žlezo, ali s parenteralnim dajanjem nekaterih kemičnih snovi.

Električno draženje **parasimpatičnih** živčnih vlaken povzroča izločanje večje količine redke, tekoče sline. Enak učinek ima dajanje nekaterih kemičnih substanc, npr. acetilholina, pilokarpina ali arekolina.

Električno draženje **simpatičnih** živčnih vlaken pa povzroča izločanje manjše količine goste, lepljive in vlecljive sline, bogate z mucinom. Enako učinkuje dajanje adrenalina.

#### a) Material:

- Kunec (fiksiran v zabojčku), raztopina pilokarpin\* hidroklorida (mkc 120 mg/L vode), kapalka, čaša, štoparica.

*\*alkaloid iz listja tropske rastline Pilocarpus puenatifolius. Povzroča slinjenje, potenje in zožitev zenic. Pri človeku 10 mg povzroči izločanje 3/4 L sline v 2 do 3 urah (muskarinski učinek). Uporablja se za zdravljenje akutnega glavkoma.*

#### b) Postopek:

1. Poskusni živali kanemo na očesno veznico kapljico pilokarpina. Kmalu opazimo izločanje redke sline, ki se izceja iz gobčka.
2. Sline zbiramo v čašo in jo prihranimo za nadaljnje poskuse.

#### c) Naloge:

1. Izmerite čas, ki poteče od aplikacije pilokarpina do pričetka izločanja sline!
2. Razložite mehanizem izločanja sline!

### 4.1.3 Vloga amilaze pri prebavi škroba

Slina vsejedov (npr. prašiča, človeka), kunca in nekaterih drugih sesalcev ter ptic vsebuje karbohidrazni ferment **amilazo**, ki je najpomembnejši ferment sline. Hidrolizira 1,4-glikozidne vezi in cepi ogljikove hidrate (škrob, glikogen) preko dekstrinov (*eritrodekstrini – rdeči, ahrodekstrini – brezbarvni*) do reducentni sladkorjev (npr. maltoze).

Amilaza je polipeptid in jo sestavlja 18 različnih aminokislin. Molekulska masa je 45000 do 50000. Optimalni pH delovanja je 6,7 do 7,2. Je sorazmerno termostabilna, saj je aktivna še pri 50 °C, na sobni temperaturi ostane aktivna 7 dni, na +4 °C pa več kot dva meseca.

*In vitro* je amilaza zelo aktivna, njen pomen pri prebavi škroba v ustih pa je majhen, saj je njeno delovanje razmeroma kratkotrajno – po začetnem delovanju v ustih nadaljuje svojo aktivnost do tedaj, ko jo inaktivira kisli pH želodčnega soka in razgradi pepsin. Preostali škrob se razgradi v tankem črevesu pod vplivom delovanja pankreasne in črevesne amilaze.

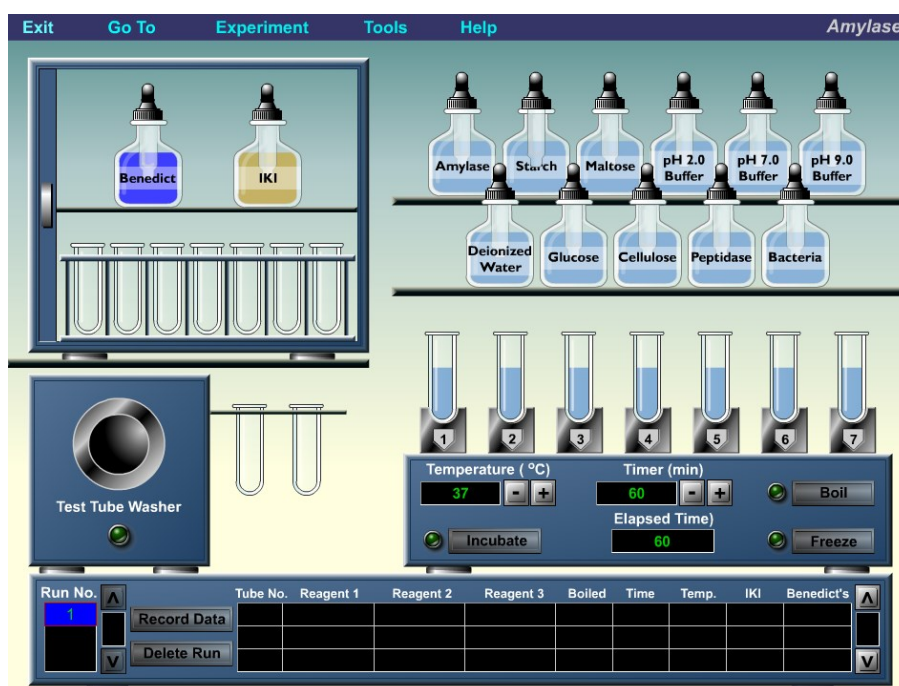
Med procesom prebave količina škroba upada, količina maltoze pa narašča. Pri poskusih *in vitro* lahko razgradnjo škroba in nastanek maltoze dokažemo z nekaterimi kemičnimi reakcijami. Reakcija IKI (jod-kalijev jodid, tudi lugol) se uporablja za dokazovanje polisaharidov. Zaradi vezave barvila na polisaharid se vzorec obarva črnomodro ali opečnatordeče. Benedictova in Fehlingova

reakcija pa se uporabljata za dokazovanje reducentnih sladkorjev in temeljita na redukciji dvovalentnega bakra in nastanku bakrovega(I) oksida, ki je ob pozitivni reakciji opečnatordeče barve.

### A) Prikaz delovanja amilaze pri prebavi škroba

Delovanje amilaze pri prebavi ogljikovih hidratov lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx. Virtualni laboratorij odpremo z izbiro poglavja **Kemični in fiziološki procesi prebave (Chemical and Physical Processes of Digestion)** v glavnem meniju, kjer v podmeniju **Experiment** izberemo poglavje **Amylase**.

Virtualni laboratorij za ta poskus prikazuje slika 4.3. V zgornjem desnem kotu ekrana sta polici z reagenti. Inkubacijska enota vsebuje stojala za epruvete in vodno kopel. Čiste epruvete so v pomivalnem stroju, od koder jih po potrebi prenašamo v stojalo. Epruvete v stojalih inkubacijske enote inkubiramo z ukazom **Incubate**. Vsebino posamezne epruvete lahko tudi prevremo ali zamrznemo (izbira številke epruvete, nato ukaz **Zavri (Boil)** ali **Zamrzni (Freeze)**). Vrata omarice za analize zgoraj levo se odprejo po končani inkubaciji. V njej sta Benedictov reagent in lugol (IKI) ter epruvete za dokaz škroba.



Slika 4.3: Virtualni laboratorij za prikaz delovanja slinske amilaze

#### a) Priprava in inkubacija vzorcev

1. V stojalo inkubacijske enote namestimo 7 epruvet.
2. Po navodilih, podanih v tabeli, napolnimo epruvete z reagenti.
3. Ko so vse epruvete napolnjene, izberemo oznako 1 pod 1. epruveto, ki se potopi v vodno kopel. Vse ostale epruvete morajo ostati v prvotnem položaju!
4. Z ukazom **Boil** prevremo vsebino 1. epruvete, ki se čez nekaj trenutkov dvigne iz kopeli.

5. Z ukazoma (+) oz. (-) nastavimo temperaturo inkubacije na 37 °C in čas inkubacije na 60 min (v virtualnem laboratoriju 60 s). Z ukazom **Incubate** poženemo inkubacijo. Inkubacijska enota meša vsebino epruвет, ob koncu inkubacije se stojalo z epruветami dvigne iz kopeli. Hkrati se odprejo vrata omarice z reagenti.

**b) Analiza vzorcev:**

V omarici za analizo sta IKI test za dokaz škroba in Benedictov reagent za dokaz maltoze. Pod reagentoma je 7 epruвет, v katere prenesemo del testnega vzorca.

1. Izberemo 1. epruветo v stojalu (spremeni se v miniaturno epruветo, nagnjeno v levo) in jo premaknemo k prvi epruветi na levi strani omarice z reagenti. Polovica vsebine prve epruвете se prelije v drugo. Postopek ponovimo še z ostalimi epruветami.
2. Kapalko iz stekleničke z IKI reagentom premaknemo do prve testne epruвете tako, da kapljica reagenta kane vanjo. Ob tem se barva vsebine epruвете lahko spremeni. Črnomodro obarvanje je znak pozitivne reakcije na škrob, če se barva reagenta ne spremeni, je reakcija na škrob negativna, blede sivo obarvanje pa kaže na šibko pozitivno reakcijo. Reagent IKI razporedimo še v ostale testne epruвете.
3. K ostanku vsebine vsake epruвете v stojalu inkubacijske enote dodamo Benedictov reagent na enak način kot predhodnega.
4. Izberemo ukaz **Boil**. Stojalo z epruветami se bo potopilo v vodno kopel in vsebina epruвет bo zavrela.
5. Ko se stojalo z epruветami dvigne iz kopeli, si ogledamo rezultate barvne reakcije. Zeleno do rdeče obarvanje kaže na prisotnost maltoze – pozitivno reakcijo (največ maltoze je v rdečerjavo obarvani vsebini). Pri negativni reakciji se barva ne spremeni. Rezultate zapišemo.
6. Če želimo poskus ponoviti ali izvesti naslednjega, vse epruвете najprej premestimo v pomivalni stroj.

	Št. epruвете						
Reagenti	1	2	3	4	5	6	7
encim	amilaza	amilaza	amilaza	dest. voda	dest. voda	amilaza	amilaza
substrat	škrob	škrob	dest. voda	škrob	maltoza	škrob	škrob
pufer [pH]	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	2,0	9,0
inkubacija	vrenje, 37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Benedictova reakcija							
IKI test							

**c) Naloge**

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - V katerih epruvetah je bila IKI reakcija pozitivna? Razložite, zakaj!
  - V katerih epruvetah je bila pozitivna Benedictova reakcija? Razložite, zakaj!
  - Kateri pH pufra omogoča največjo aktivnost amilaze?
  - Ali je amilaza, ki je v slini, aktivna tudi v želodcu?
  - Kakšen učinek ima segrevanje do vrelišča na aktivnost encimov?

**B) Vpliv nekaterih dejavnikov na aktivnost amilolitičnih encimov sline****a) Material:**

- Slina človeka, prašiča ali kunca, škrobovica (mkc 2 g/L), raztopine HCl snkc 0,1 mol/L (mkc 3,6 g/L), NaOH snkc 0,1 mol/L (mkc 4 g/L), Fehling I in II, kapalke, gorilniki, držala za epruvete in vodna kopel (segreta na 37 do 39 °C).

**b) Postopek:**

1. Označimo štiri epruvete in v vsako odpipetiramo 6 ml škrobovice.
2. V tretjo epruveto odpipetiramo 1 ml solne kisline in v četrto 1 ml natrijevega hidroksida.
3. V drugo epruveto dodamo 0,5 ml sline, ki smo jo predhodno prekuhali.
4. V prvo, tretjo in četrto epruveto dodamo po 0,5 ml native sline.
5. Epruvete postavimo v vodno kopel (za 20 min).
6. Po končani inkubaciji izvedemo v vsaki epruveti **Fehlingovo reakcijo** po navedenem postopku:
  - a) v večji epruveti pomešamo reagenta I in II v enakih količinah,
  - b) iz vsake epruvete, v kateri smo delali poskus, prelijemo približno 1 ml vsebine v drugo epruveto in dolijemo enako količino pripravljenega Fehlingovega reagenta; mešanico prevremo.
  - c) Ob pozitivni reakciji se na dnu epruvete pojavi rdečkasta usedlina.
7. Rezultate vnesite v tabelo!

Št. epruvete	Reagenti		Inkubacija	Rezultati	Razlaga
1	škrobovica (6 ml)	–	nativna slina	20 min / 37 °C	
2		–	prekuhana slina		
3		HCl (1 ml)	nativna slina		
4		NaOH (1 ml)	nativna slina		

**c) Naloge:**

- a. Shematično prikažite potek vaje!
- b. Razložite potek Fehlingove reakcije!
- c. Ugotovite in razložite pojav pozitivne ali negativne Fehlingove reakcije v vaših epruvetah!

**C) Prikaz amilolitičnega delovanja sline****a) Material:**

- Slina človeka, kunca ali prašiča (razredčena z vodo v razmerju 1 : 5), škrobovica (mkc 2 g/L), lugol, epruvete (10), pipete (10 ml), kapalke, vodna kopel (segreta na 37–39 °C).
- Priprava škrobovice: Škrob v hladni vodi le nabrekne, v topli pa se koloidno raztaplja. Zato odtehtamo 2 g škroba, ga zmešamo z nekaj mililitri destilirane vode in suspenzijo vlijemo v 800 ml vrele destilirane vode. Ko se raztopina ohladi, dodamo še destilirane vode do 1L.
- Priprava lugola: Zatehtamo 100 g čistega joda in 30 g KI in dodamo destilirano vodo do 1000 ml. Za poskus uporabimo raztopino, razredčeno v razmerju 1 : 10 z destilirano vodo.

**b) Postopek:**

1. Pripravimo deset epruvet in jih oštevilčimo.
2. V vsako epruveto odpipetiramo po 10 ml škrobovice.
3. V vsako epruveto dodamo 2 kapljici lugola in vsebino ponovno dobro premešamo.
4. V prvo epruveto dodamo 2 kapljici sline, v vsako naslednjo pa dve kapljici več. Vsebino epruvet dobro premešamo.
5. Epruvete postavimo za 20–30 minut v vodno kopel.
6. Rezultate poskusa vnesemo v tabelo!
- 7.

Št. epruvete	Substrat	Indikator	Slina [kapljice]	Rezultat [obarvanje]	Razlaga
1	škrobovica (10 ml)	lugol (2–4 kapljice)	2		
2			4		
3			6		
4			8		
5			10		
6			12		
7			14		
8			16		
9			18		
10			20		

**c) Naloge:**

1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Opišite barvne odtenke v epruvetah pred inkubiranjem in po njem in razložite vzroke za njihov nastanek!

#### 4.1.4 Dokaz beljakovin v slini

Beljakovine spadajo med organske sestavine sline. Njihova količina je odvisna od vrste živali in njenega fiziološkega stanja.

**a) Material:**

Slina kunca, triklorocetna kislina (mkc 100 g/L).

**b) Postopek:**

V epruveto odpipetiramo 2 ml sline in dodamo 2 ml triklorocetne kisline. Ob tem opazimo nastanek megličastih kosmičev. To so beljakovine, ki so denaturirale pod vplivom triklorocetne kisline.

**c) Naloge:**

1. Shematično prikažite postopek!
2. Katere beljakovine se nahajajo v slini?

#### 4.1.5 Dokaz tiocianatov v slini

Tiocianati (alkalni rodanidi) so produkt metabolizma cianidov, ki v organizem prihajajo v majhnih količinah s hrano, rastlinskimi plodovi in pri ljudeh s cigaretним dimom. Izločeni tiocianati se v slini nahajajo predvsem v obliki NaCN in KCN. Po dodatku FeCl<sub>3</sub> se obarvajo intenzivno oranžno do rdeče.

**a) Material:**

Slina človeka in kunca, raztopina FeCl<sub>3</sub> (0,5 ml raztopine s snkc 0,62 mol/L (mkc 100g/L) razredčimo z 20 ml destilirane vode), epruvete, kapalke.

**b) Postopek:**

V epruveto z 1 ml sline dodamo 1–2 kapljici raztopine FeCl<sub>3</sub>.

**c) Naloge:**

- a. Opišite barvno reakcijo po dodatku FeCl<sub>3</sub> v slini človeka, kunca ali drugih domačih živali!
- b. Razložite vzroke za ugotovljene razlike!

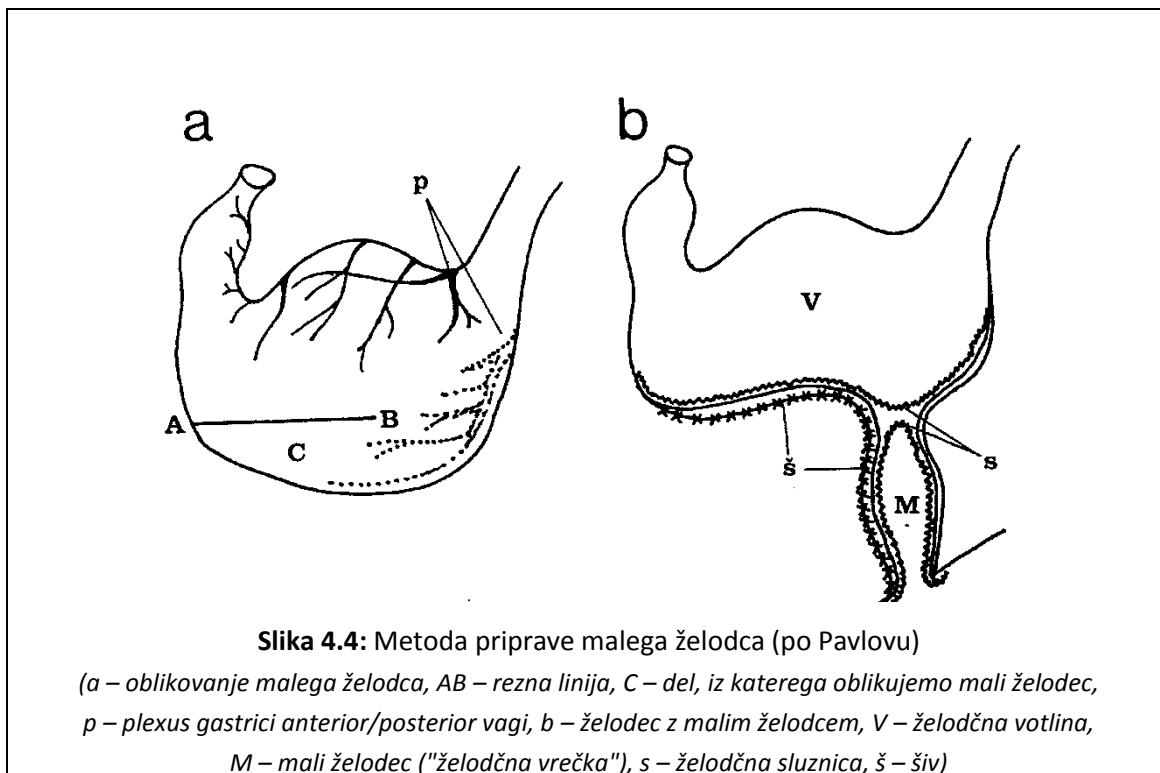
## 4.2 PREBAVA V ŽELODCU MONOGASTRIČNIH ŽIVALI

Glavna funkcija želodca je shranjevanje sprejete hrane in njeno mešanje. Želodec tudi uravnava prehajanje hrane v tanko črevo. V želodčni sluznici se nahajajo celice, ki izločajo prebavne encime in solno kislino in omogočajo razgradnjo nekaterih hranilnih snovi, predvsem beljakovin.

### 4.2.1 Metode zbiranja želodčne vsebine in želodčnega soka ter proučevanje želodčne sekrecije

Pri psu lahko, podobno kot pri človeku, vzorce želodčne vsebine oziroma želodčnega soka odvezemamo z želodčno sondo, ki jo uvedemo v želodec skozi ustno votlino in požiralnik. Narkotiziranemu psu vstavimo želodčno sondo in parenteralno (v žilo, mišico ali podkožno) damo snov, ki vzpodbuja želodčno izločanje (*lokalno* – alkohol, kofein; *parenteralno* – histamin ali njegove derivate, gastrinske preparate). Z vodno vakuumsko črpalko črpamo želodčni sok v stekleno bučko. Ta metoda je pri živalih le omejeno uporabna, saj jo lahko izvedemo le v narkozi.

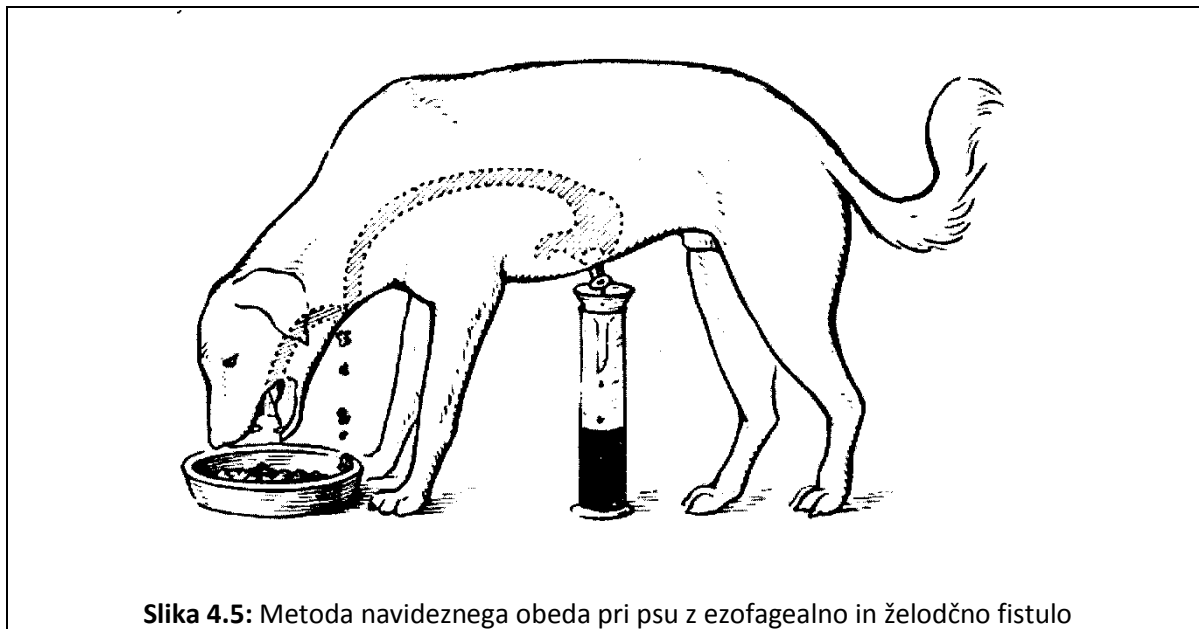
V preteklosti so za proučevanje izločanja želodčnega soka najpogosteje uporabljali različne tipe želodčnih fistul. Z njimi so lahko v kateremkoli obdobju prebave in v popolnoma fizioloških okoliščinah pridobivali čisti želodčni sok. Operacijo so izvajali v narkozi in popolnoma aseptično.



- Najbolj znana je metoda priprave **malega želodca po Pavlovu**. Mali želodec (slika 4.4) se pripravi s posebno operacijo, pri kateri se napravi najprej rez v fundusnem delu želodca, ki je vzporeden z malo krivino. Nato se preparira del želodčne sluznice in stene tako, da nastaneta dva dela: del, ki je v stiku z drugim prebavnim traktom, in del ("mali želodec"), ki je s fistulo povezan z zunanjo površino trebušne stene, ima pa ohranjeno ožiljenost in oživenost, zato bo izločal želodčni sok enako kot veliki želodec, le da ga bo hrana obšla. Želodčni sok se lahko zbira po cevki (kanili), ki se namesti na odprtino malega želodca.



- **Metoda navideznega obeda** (slika 4.5) se izvede tako, da se živali (npr. psu) najprej operativno naredi želodčna fistula. Kasneje se izvede še ezofagotomija (prerezanje požiralnika). Na ta način pogoltnjeni zalogaj pade skozi prerezani požiralnik. Zaradi refleksov, ki nastanejo ob jemanju, žvečenju in požiranju hrane, se želodčni sok izloča in izhaja skozi fistulo.



Slika 4.5: Metoda navideznega obeda pri psu z ezofagealno in želodčno fistulo

#### 4.2.2 Slojevito nalaganje hrane v želodcu

V času jemanja hrane se čvrsta hrana nalaga v želodec brez znatnega povečanja tlaka v njem zaradi njegovega *plastičnega tonusa*. To je lastnost želodca (in tudi drugih votlih organov z gladkim mišičjem), da se prilagajajo stopnji napolnjenosti, vendar se pri tem ne spreminja tonus gladkih mišičnih vlaken v njihovi steni in ne poveča pritisk v njihovi notranjosti. Čvrsta hrana se nalaga v želodec v takem zaporedju, kot vanj prihaja, in sicer koncentrično v plasteh (= **stratifikacija**) tako, da tista, ki je bila pogoltnjena najprej, leži najbolj ob steni želodca, drugi zalogaji pa tvorijo vrhnje sloje. Stratifikacija hrane je dokazana pri številnih živalskih vrstah z enodelnim želodcem in predstavlja osnovo za nadaljnjo prebavo. Prebava poteka od stene želodca proti notranjosti s postopnim prehajanjem želodčnega soka k sredini želodčne vsebine. Tam prebava do inaktivacije poteka še pod vplivom fermentov iz sline in same hrane.

##### a) Material:

- Poskusna žival (miš ali podgana), različno obarvana hrana, eter, pribor za seciranje.

##### b) Priprava preparatov:

1. Različno obarvano hrano pripravimo tako, da posušen kruh namočimo v različne zelenjavne sokove (pesa, korenje, špinača) in ga ponovno posušimo. Namesto naravnih sokov lahko uporabimo tudi različne barve za živila, drobno zmleto meso ali slanino pa pomešamo z živalskim ogljem.
2. Poskusno žival, ki smo ji za nekaj časa (1 dan) odtegnili hrano, zaporedoma hranimo z različno obarvano hrano, dokler se ne nasiti.
3. Nato žival neboleče usmrtime, odpremo trebušno votlino ter podvežemo in izrežemo želodec.

4. Organ zamrzemo in vzdolžno prerežemo. Na prerezu lahko vidimo sloje hrane, naložene v takem zaporedju, kot smo žival hranili. Če je med hranjenjem in usmrčitvijo preteklo nekaj časa, vidimo, da na pilorusnem delu slojevitost izginja zaradi mešanja želodčne vsebine.

**c) Naloge:**

- Oglejte si prereze želodcev in narišite skico preparatov!

### 4.2.3 Prikaz praznjenja želodca pri podganah

Praznjenje želodca je kontinuiran proces, med katerim želodčna vsebina (himus) v majhnih količinah prehaja v duodenum. Hitrost praznjenja želodca se lahko znatno spreminja in je odvisna od vrste živali, količine hrane, njenih fizikalnih lastnosti (velikost delcev, osmotski tlak in viskoznost) in kemične sestave (pH). Pri psu in človeku ima vlogo tudi volumen himusa, ki pride v duodenum.

**a) Material:**

- Podgane, krma za podgane, eter, pribor za seciranje, menzura (napolnjena s fiziološko raztopino).

**b) Postopek:**

1. Skupino 30 podgan nakrmimo do sitega in jim odvzamemo ostalo hrano.
2. S presledki dveh ur evtanaziramo po dve podgani.
3. Podvezane želodce evtanaziranih podgan izrežemo in shranimo v zamrzovalniku.
4. Volumen želodca izmerimo na osnovi odčitane spremembe volumna vsebine menzure, v katero potopimo preparat.

**c) Naloge:**

1. Izmerite prostornino želodcev v različnih obdobjih po hranjenju!
2. Rezultate meritev vnesite v tabelo in grafično ponazorite hitrost praznjenja želodcev!

Spol	Št.	10.30 (tako po hranjenju)	13.30 (po 3 urah)	16.00 (po 5,5 urah)	19.30 (po 9 urah)	22.00 (po 11,5 urah)	7.00 (po 21,5 urah)
samci	1						
	2						
povprečje							
samice	3						
	4						
	5						
povprečje							

### 4.2.4 Kemični procesi prebave v želodcu

V želodcu monogastričnih živali se pričinja razkroj beljakovin do polipeptidov pod vplivom delovanja encima pepsina. V procesu razgradnje beljakovin sodeluje tudi solna kislina (HCl).

**Pepsin** je glavni proteolitični encim želodčnega soka, ki razgradi skoraj vse proteine (razen protaminov, keratina in mucina), ki pridejo v želodec, do peptidov. Kot proferment pepsinogen ga izločajo glavne celice fundusnega dela želodčne sluznice, aktivira pa HCl.

**Solna kislina** je glavna in fiziološko najpomembnejša sestavina želodčnega soka, ki se nahaja v želodčnem soku vseh vretenčarjev. Nastaja v obložnih (acidogenih, acidofilnih ali parietalnih) celicah fundusnega dela želodca. Njena koncentracija v želodčnem soku je 0,03 do 0,14 mol/L (0,1 do 0,5 %). Funkcije HCl so aktiviranje pepsinogena v pepsin in ustvarjanje optimalnega pH za proteolitično delovanje pepsina, denaturacija beljakovin (pretvorba v kisle albumine, nabrekanje podpornih beljakovin), pretvorbo netopnih soli v topne (npr.  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) ter baktericidno delovanje (zaradi nizkega pH).

Količina izločene HCl je merilo sposobnosti izločanja želodčne sluznice. Izločanje solne kisline je mogoče pospešiti z dajanjem lokalnih stimulatorjev (npr. alkohol, kofein), ki jih s sondo lahko damo naravnost na sluznico, ali parenteralnih stimulatorjev (histamin in njegovi derivati, ter gastrinski preparati).

#### A) Prikaz delovanja pepsina pri prebavi beljakovin

Delovanje pepsina pri prebavi beljakovin lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx. Virtualni laboratorij odpremo z izbiro poglavja **Kemični in fiziološki procesi prebave (*Chemical and Physical Processes of Digestion*)** v glavnem meniju, kjer v podmeniju **Experiment** izberemo poglavje **Pepsin**. Virtualni laboratorij za izvedbo poskusa je opisan v vaji 4.1.3A. Pri tem poskusu je v omarici spektrofotometer, s katerim ob koncu inkubacije izmerimo optično gostoto vzorcev.

Substrat pri poskusu je BAPNA (N-benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid), sintetični protein, katerega raztopina je brezbarvna in prosojna. V prisotnosti aktivnega encima, ki razgrajuje proteine, pa raztopina postane rumena. To lastnost lahko uporabimo za dokaz pepsinske aktivnosti: raztopina se obarva rumeno, če encim razgradi BAPNA, in ostane brezbarvna, če encima ni ali je neaktiven. Prednost reakcije je v tem, da ne potrebujemo dodatnih indikatorjev. Intenzivnost reakcije izmerimo fotometrično. Naprava presvetli vzorec in izmeri količino svetlobe, ki se absorbira v vzorcu (optično gostoto). Brezbarvna raztopina svetlobe ne absorbira, medtem ko ima obarvana raztopina razmeroma veliko optično gostoto. Čeprav lahko vidimo rumeno obarvanje, nastalo po prebavi BAPNA s pepsinom, pa spektrofotometer natančneje izmeri rezultate reakcije. Intenzivnost obarvanja je premo sorazmerna s količino prebavljene beljakovine.

#### a) Priprava in inkubacija vzorcev

1. V stojalo inkubacijske enote namestimo 6 epruвет.
  2. Po navodilih, podanih v tabeli, napolnimo epruветe z reagenti.
  3. Ko so vse epruветe napolnjene, izberemo oznako 1 pod 1. epruветo in ta se potopi v vodno kopel. Vse ostale epruветe morajo ostati v prvotnem položaju.
  4. Izberemo ukaz **Boil**, da zavremo vsebino 1. epruветe. Epruветeta se čez nekaj trenutkov dvigne, njena vsebina je prevreta.
  5. Z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** nastavimo temperaturo inkubacije na 37 °C in čas na 60 min (inkubacija v virtualnem laboratoriju traja 60 sek!).
-

6. Izberemo ukaz **Incubate** za pričetek inkubacije. Inkubacijska enota začne mešati vsebino epruвет, ki se ob koncu inkubacije dvignejo iz kopeli. Hkrati se odprejo vrata omarice za analizo.

**b) Analiza vzorcev:**

1. Izberemo 1. epruветo v stojalu in jo premaknemo v stojalo spektrofotometra.
2. Izberemo ukaz **Analyze**. Optično gostoto odčitamo v prikazu spektrofotometra.
3. Epruветo vrnemo v inkubacijsko enoto in ponovimo meritev še z ostalimi epruветami.

**c) Naloge:**

1. Rezultate meritev vnesite v spodnjo tabelo ((+) pozitivna reakcija, (-) negativna reakcija).
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Kateri pH omogoča največjo pepsinsko aktivnost?
  - Primerjajte rezultate meritev v 1. in 2. epruветi in jih razložite!

	Številka epruветe					
Reagenti	1	2	3	4	5	6
encim	pepsin	pepsin	pepsin	dest. voda	pepsin	pepsin
substrat	BAPNA	BAPNA	dest. voda	BAPNA	BAPNA	BAPNA
pufer [pH]	2,0	2,0	2,0	2,0	7,0	9,0
inkubacija	vrenje, 37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Optična gostota						

**B) Delovanje pepsina in solne kisline pri prebavi beljakovin****a) Material:**

- Kristalinični pepsin, raztopine HCl snkc 0,1 mol/L (mkc 3,6 g/L), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> snkc 0,1 mol/L (mkc 10 g/L), biuretski reagent, tanke rezine kuhanega jajčnega beljaka, epruvete, pipete, vodna kopel (segreta na 37–39 °C).

**b) Postopek:**

1. Pripravimo tri epruvete ter v prvo in drugo dodamo 5 ml HCl, v tretjo pa 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
2. V vsako epruveto dodamo nekaj rezin jajčnega beljaka.
3. V prvo in tretjo epruveto dodamo za noževno konico kristaliničnega pepsina.
4. Vsebinsko epruvet dobro premešamo in 30 minut inkubiramo v vodni kopeli.
5. Po končani inkubaciji z vsebino vsake epruvete izvedemo biuretsko reakcijo (v 2 ml vzorca dodamo 3 ml biuretskega reagenta).

**c) Naloge:**

1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Razložite principe biuretske reakcije!
3. Razložite rezultate reakcij v epruvetah!

	Št. epruvete		
	1	2	3
Reagenti	2 ml HCl	2 ml HCl	2 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	jajčni beljak	jajčni beljak	jajčni beljak
	pepsin		pepsin
Inkubacija	30 min/37–39 °C		
Biuretska reakcija			
Razlaga			

### **C) Mettov poskus za določanje aktivnosti pepsina**

Mettov poskus je najstarejši način določanja pepsinske aktivnosti želodčnega soka, ki je v praksi opuščen. Metodo je uvedel Mett, sodelavec Pavlova pri raziskovanju želodčnega izločanja.

#### **a) Material:**

- Surov jajčni beljak, kapilarna cevčica (premera 2 mm, dolga vsaj 2 cm), želodčni sok, čaša z destilirano vodo, gorilnik, termostat, lupa, milimetrski papir.

#### **b) Postopek:**

1. Kapilarno cevčico napolnimo z beljakom in jo postavimo v vrelo vodo, da beljak koagulira.
2. Napolnjeno cevčico postavimo v čašo ali epruveto z želodčnim sokom in inkubiramo v termostatu (24 ur na 37 °C).
3. Po končanem inkubiranju vzamemo cevčico iz želodčnega soka in z lupo ter milimetrskim papirjem izmerimo, koliko beljaka se je razkrojilo.
4. Iz dolžine prebavljenega jajčnega beljaka izračunamo pepsinsko aktivnost vzorca. Po Schützovem pravilu raste dolžina prebavljenega beljaka s kvadratom količine pepsina v soku (Primer: 1 mm beljaka → pepsinska aktivnost =  $1^2 = 1$ ; 3 mm beljaka → pepsinska aktivnost =  $3^2 = 9$ ).

#### **c) Naloge:**

1. Shematično prikažite izvedbo poskusa!
2. Pripravite Mettove cevčice!
3. Izmerite in izračunajte aktivnost pepsina v vzorcih želodčnega soka!

### **Č) Titracijsko določanje kislosti želodčnega soka**

#### **a) Material:**

- Želodčni sok psa, raztopina NaOH snkc 0,1 mol/L (mkc 4 g/L), metiloranž ali Topferjev reagent, alkoholna raztopina fenolftaleina, bireta, pipete, Erlenmeyerjeva bučka, kapalke.

#### **b) Postopek:**

1. V erlenmajerico odpipetiramo 5 ml želodčnega soka ter dodamo po 1 kapljico metiloranža in fenolftaleina (želodčni sok se obarva rdeče).
2. Titriramo z NaOH – pri tem se barva vsebine erlenmajerice spreminja od rdeče preko oranžne in rumene ponovno do rdeče. Ob ponovnem nastanku rdečega obarvanja odčitamo porabo NaOH v bireti.
3. Izračunamo koncentracijo želodčnega soka. Izračun opravimo s sklepnim računom ali po formuli:

$$C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} = C_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}}$$

(C – koncentracija, V – volumen)

#### **c) Naloge:**

- Izračunajte koncentracijo HCl v vzorcu želodčnega soka!

## 4.3 PREBAVA V PREDŽELODCIH IN SIRIŠČNIKU PREŽVEKOVALCEV

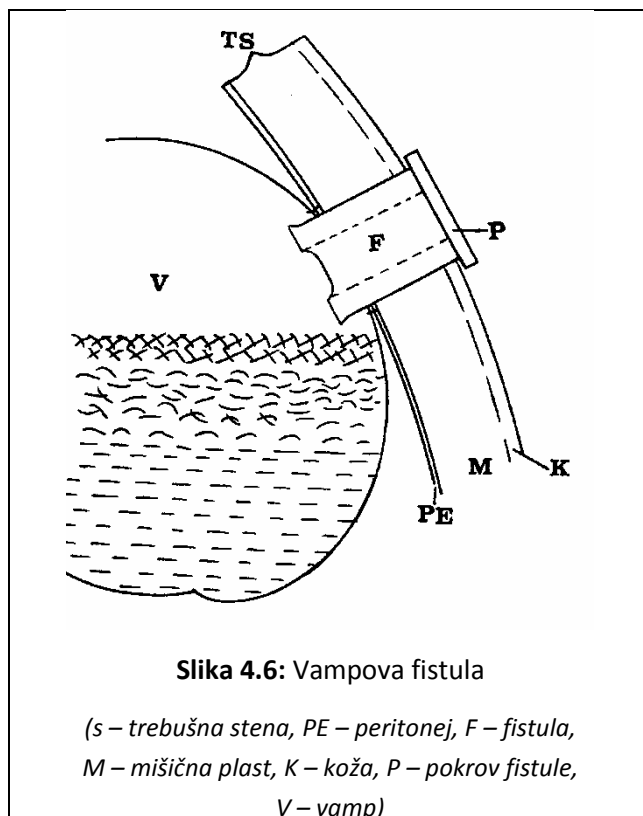
Predželodci prežvekovalcev (vamp, kapica, prebiralnik) so prilagojeni za mikrobo fermentacijo zaužite hrane. Na ta način se razgrajujejo sestavine hrane (predvsem celuloza), ki sicer ne bi bile dostopne prebavnim procesom. Proces fermentacije se lahko odvijajo le v dobro kontroliranih pogojih, ki jih omogočajo primerna sekrecija, temperatura in gibanje vampa. Siriščnik prežvekovalcev ima funkcijo pravega želodca.

### 4.3.1 Odvzem vampove vsebine in proučevanje prebavnih procesov v vampu

Pri proučevanju prebave v vampu je za ugotavljanje biokemičnih procesov pretvorbe potrebno jemati vzorce vampove vsebine, kar je možno na več načinov.

Tekočo vampovo vsebino lahko jemljemo s posebno sondo. Ta zadrži grobe delce, tekočino pa načrpamo v steklenico.

Za dolgotrajnejše proučevanje prebavnih procesov v vampu se najpogosteje uporablja vampova fistula. Z operativnim posegom najprej odpremo trebušno steno na levi strani, steno vampa čimbolj približamo operacijski rani, jo pazljivo (da se vsebina vampa ne prelije v peritonealno votlino) prerežemo in prišijemo robove rane na peritonej. Zašijemo tudi operacijsko rano na trebušni steni. V tako narejeno fistulo vstavimo plastičen ali gumijast cevast nastavek in ga prišijemo na robove rane. Nastavek ima na zunanji strani pokrov. Potem, ko se rana zaraste, lahko skozi cevasti nastavek iz vampa jemljemo vzorce ali pa v vamp dodajamo različne snovi, katerih kemično pretvorbo ali vpliv na prebavne procese proučujemo.



### 4.3.2 Opazovanje predželodcev telet

Posebnosti prebave pri prežvekovalcih so povezane z anatomsko zgradbo njihovega želodca, ki ima štiri glavne dele: vampa (*rumen*), kapico (*reticulum*), prebiralnik (*omasum*) in siriščnik (*abomasum*).

V prvem obdobju življenja prežvekovalcev ta organ spreminja svojo obliko. Predželodci v svojem razvoju določen čas po rojstvu rastejo hitreje kot siriščnik, svojo dokončno velikost in obliko pa dosežejo pri govedu šele pri starosti enega leta in pol. Pri novorojenih teletih velikost kapice in vampa skupaj ne preseže polovice volumna siriščnika. Pri 10 do 12 tednih starosti je njuna skupna prostornina že dvakrat, pri 4 mesecih štirikrat, pri odraslih živalih pa desetkrat večja kot prostornina siriščnika.

#### a) Material:

- Preparati telečjih predželodcev so pripravljani po naslednjem postopku: po zakolu živali so bili želodci odvzeti, izpraznjeni, podvezani in napihnjeni, po daljšem sušenju na zraku pa prepojeni s šelakom.

#### b) Naloge:

1. Oglejte si preparate in določite posamezna področja želodcev!
2. Shematično narišite preparate!

### 4.3.3 Opazovanje vsebine vampa, prebiralnika in siriščnika

Zaradi posebnosti prebave v predželodcih prežvekovalcev so tudi fizikalne in kemične lastnosti ingesta v posameznih delih različne.

#### a) Material:

- Vsebina vampa, prebiralnika in siriščnika goveda ali ovce, indikatorski papirčki, predmetnice, lupa.

#### b) Naloge:

1. Oglejte si vsebino govejih predželodcev in siriščnika!
2. Opišite videz, vlažnost, konsistenco vsakega vzorca!
3. Izmerite pH vzorcev!
4. Položite majhno količino vsebine vampa, prebiralnika ali siriščnika na steklo, pod katerega ste položili milimetrski papir, in jo razprostrite po površini. Z lupo preglejte 100 naključno izbranih vlaknastih delcev in izmerite njihovo dolžino. Izračunajte povprečno dolžino delcev!
5. Vnesite rezultate v spodnjo tabelo!

Vsebina	Konsistenca	pH	Velikost delcev [mm]
vamp			
prebiralnik			
siriščnik			



#### 4.3.4 Poslušanje vampovih kontrakcij

Razen povrhnjih peristaltičnih kontrakcij obstaja tudi intenzivno, dobro slišno krčenje določenih delov predželodcev z usklajenim potekom ritmike in vrstnega reda, ki se stalno (ciklično) ponavlja. To gibanje imenujemo revolucija predželodcev in omogoča premikanje, prelivanje, drobljenje in mešanje hrane, ki pride v predželodce. Gibe lahko ugotovljamo s poslušanjem (avskultacijo), z uvajanjem pnevmatskih naprav in zapisovanjem sprememb tlaka v posameznih delih ter s pomočjo rentgena.

**a) Material:**

- Živo govedo ali drobnica, fonendoskop.

**b) Postopek:**

Opno stetoskopa prislonimo v levo lakotnico in vsaj 5 min poslušamo ruminacije.

**c) Naloge:**

1. Ugotovite število vampovih kontrakcij v 5 minutah!
2. Opišite zvoke, ki ste jih slišali!

#### 4.3.5 Kemični procesi prebave v predželodcih in siriščniku prežvekovalcev

##### A) Dokaz mlečne kisline v vampovi vsebini

Pri razgradnji ogljikovih hidratov (npr. škrob, celuloza) v nižje saharide jih del izkoristijo bakterije za svoje potrebe (rast, razmnoževanje), drugi del pa cepijo in predelajo v organske kisline. Številne nižje maščobne kisline zelo dobro vsrkava sluznica predželodcev. V vampu so najpogostejše očetna, propionska in maslena kislina, ki skupaj predstavljajo 85 % vseh nastalih maščobnih kislin, v manjših količinah pa nastajajo tudi mravljinčna, jantarjeva, izomaslena, valerianska in druge. Ob razgradnji ogljikovih hidratov v vampu nastaja tudi mlečna kislina, ki je tudi vir za očetno in propionsko kislino.

**a) Material:**

- Precejena vampova vsebina, raztopine fenola snkc 0,2 mol/L (mkc 20 g/L),  $\text{FeCl}_3$  snkc 0,62 mol/L (100 g/L), mlečne kisline snkc 1 mol/L (90 g/L), pipeta (10 ml), epruveta, kapalke.

**b) Postopek:**

1. V epruveto odpipetiramo 5 ml fenola in dodamo 1–2 kapljici  $\text{FeCl}_3$ . Zaradi nastanka železovega(III) fenolata se prej brezbarvna raztopina obarva intenzivno modro.
2. Polovico vsebine odpipetiramo v drugo epruveto.
3. V prvo epruveto dolijemo nekaj ml precejene vampove vsebine, v drugo pa mlečno kislino. Modra barva v obeh epruvetah preide v rumenozeleno zaradi nastanka železovega(III) laktata.

**c) Naloge:**

- Shematično prikažite izvedbo vaje!

### **B) Razkroj uree v vampovi vsebini**

V vampovi vsebini obstajajo bakterije, ki iz proteinov in anorganskih dušikovih spojin proizvajajo lastne organske dušikove spojine, ki jih tudi drugi mikrobi izkoriščajo za svoj razvoj. Zato prežvekovalci za graditev svojih proteinov lahko izkoriščajo razne dušikove organske in neorganske spojine, kot so npr.  $\text{NH}_3$ , nitrati, nitriti, amidi, urea, zaradi zmožnosti bakterijske flore, da te snovi predela v lastne beljakovine. Takih dušikovih snovi bakterije v vampu asimilirajo toliko, da v obroku lahko pokrijejo 1/3 potreb prežvekovalcev po beljakovinah. Urea prihaja v vamp s slino, skozi vampovo sluznico in s krmo, saj jo dodajajo v močna krmila namesto beljakovin.

#### **a) Material:**

- Precejena vampova vsebina, kristalinična urea, raztopine  $\text{HgCl}_2$  0,07 mol/L (20 g/L), KJ 0,3 mol/L (50 g/L), NaOH 1,25 mol/L (50g/L), amonijak, epruvete, kapalka, vodna kopel (segreta na 37–39 °C).

#### **b) Postopek:**

1. Pripravimo Nesslerjev reagent (za ugotavljanje prisotnosti amonijaka) po navedenem postopku:
  - V epruveto nalijemo približno 2 do 3 ml  $\text{HgCl}_2$  in dolijemo nekaj ml KJ. Pri tem nastane opečnatooranžna oborina živosrebrovega jodida.
  - Nato še dodajamo KJ, dokler oborina zaradi raztapljanja v višku KJ popolnoma ne izgine. Do vrha epruvete nalijemo NaOH in vsebino dobro premešamo.
  - Reagent preizkusimo tako, da nekaj ml odpipetiramo v drugo epruveto in vanjo vpihnemo hlape amonijaka. Dobro pripravljen reagent se ob tem takoj obarva oranžno.
2. V dve epruveti nalijemo 5–6 ml vampove vsebine.
3. V eno epruveto dodamo za noževno konico kristalinične uree, premešamo, zamašimo in obe epruveti postavimo za 30 minut v vodno kopel.
4. Po poteku inkubacije ugotavljamo prisotnost amonijaka tako, da iz vsake epruvete prelijemo nekaj vsebine v epruveti z Nesslerjevim reagentom.

#### **c) Naloge:**

1. Razložite nastanek reakcije v vašem vzorcu!
2. Opišite vlogo uree pri prežvekovalcih!

### **C) Prikaz prebave celuloze**

Prebavo celuloze lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx. Virtualni laboratorij odpremo z izbiro poglavja **Kemični in fiziološki procesi prebave (*Chemical and Physical Processes of Digestion*)** v glavnem meniju, kjer v podmeniju **Experiment** izberemo poglavje **Amylase**. Virtualni laboratorij in izvedba poskusa sta enaka opisanemu v vaji 4.1.3A.

#### **a) Priprava in inkubacija vzorcev:**

1. V stojalo inkubacijske enote namestimo 7 epruвет.
2. Po navodilih, podanih v spodnji tabeli, napolnimo epruvete z reagenti.
3. Ko so vse epruvete napolnjene, izberemo oznako 1 pod 1. epruveto, ki se potopi v vodno kopel. Vse druge epruvete morajo ostati v prvotnem položaju!
4. Z ukazom **Freeze** zamrznemo vsebino 1. epruvete (–25 °C). Epruveta se čez nekaj trenutkov dvigne.
5. Poskus nadaljujemo po enakem postopku, kot opisujeta stopnji 5. in 6. poskusa 4.1.3A.

Reagenti	Št. epruvete						
	1	2	3	4	5	6	7
encim	amilaza	amilaza	amilaza	amilaza	amilaza	peptidaza	bakterije
substrat	škrob	škrob	glukoza	celuloza	celuloza	škrob	celuloza
pufer [pH]	7,0	7,0	7,0	7,0	dest. voda	7,0	7,0
inkubacija	zamrznitev, 37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Benedictova reakcija							
IKI test							

**b) Analiza vzorcev:**

Postopek analize vzorcev je enak kot v poskusu 4.1.3A. Zato ponovimo stopnje 1. do 8. tega poskusa.

**c) Naloge:**

1. Odgovorite na spodnja vprašanja:

- V katerih epruvetah je bila IKI reakcija pozitivna? Razložite, zakaj!
- V katerih epruvetah je bila pozitivna Benedictova reakcija? Razložite, zakaj!
- Kakšen je bil učinek zamrznitve vsebine v 1. epruveti?
- Kakšen je bil učinek amilaze na glukozo v 3. epruveti? Razložite!
- Kakšen je bil učinek peptidaze v 6. epruveti?

**D) Koagulacija mleka pod vplivom himozina**

Mlečna beljakovina kazein se v mleku nahaja v obliki micel. Na površini micela je  $\kappa$  (*kappa*) frakcija, ki ščiti notranje sloje ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  frakcije) pred stikom s  $\text{Ca}^{2+}$ , stabilizira micela in preprečuje njihovo združevanje.

V želodcu mladih sesalcev se nahaja encim **himozin (sirišče, labferment)**, ki mleko koagulira in omogoča razkroj mlečnih beljakovin s pepsinom. Mehanizem delovanja temelji na razgradnji  $\kappa$  frakcije kazeinske molekule, zaradi česar se frakcije v jedru spojijo s kalcijevimi ioni (*polimerizirajo*) v netopni parakazeinat (sir).

**a) Material:**

- Sirilo (1 : 10000, tj. 1 del sirila sesiri 10000 delov mleka), kravje mleko, raztopine očetne kisline 0,3 mol/L (18 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  0,24 mol/L (20 g/L), amonijevega oksalata –  $(\text{NH}_4)_2 \text{C}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,14 mol/L (20 g/L), epruvete, pipete, kapalke, vodna kopel (segreta na 37–39 °C).

**b) Postopek:**

1. Označimo 4 epruvete in v vsako odpipetiramo po 5 ml mleka.
2. V drugo epruveto dodamo 2 ml očetne kisline, v tretjo 2 ml  $\text{NaHCO}_3$  in v četrto 2 ml amonijevega oksalata.
3. V vsako epruveto dodamo še nekaj kapljic himozina.

4. Vsebino epruvet dobro premešamo in jih v vodni kopeli inkubiramo nekaj minut.
5. Rezultate vnesemo v spodnjo tabelo.

**c) Naloge:**

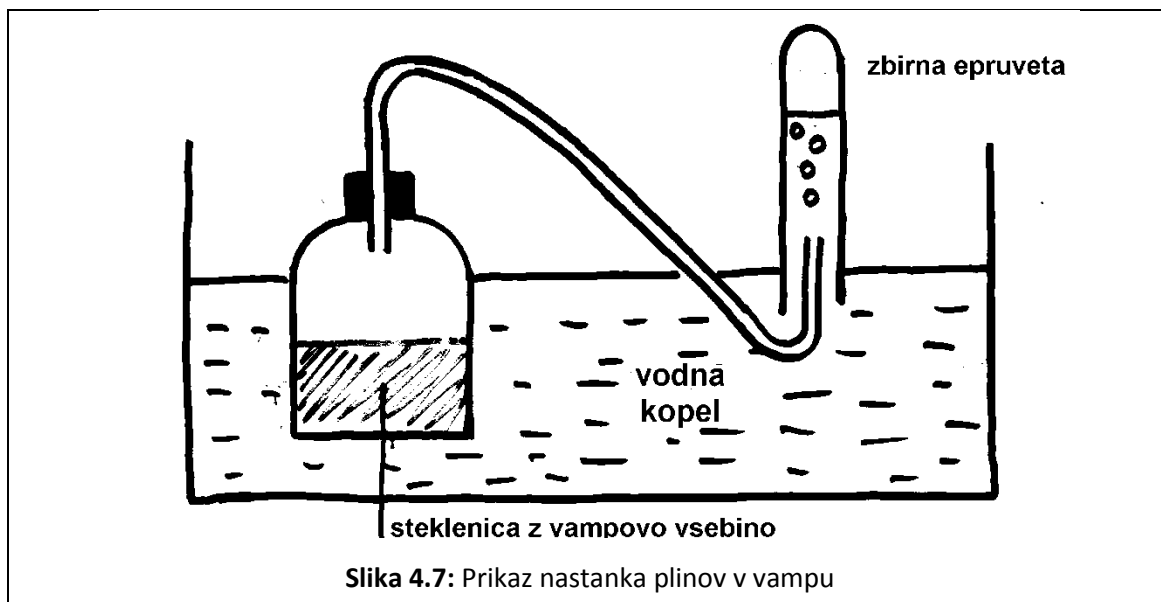
1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Razložite potek reakcij v epruvetah!

•

Št. epruvete	Mleko [ml]	Raztopine (po 2 ml)	Himozin [kapljice]	Rezultati	Razlaga
1	5	–	2–3		
2	5	ocetna k.	2–3		
3	5	NaHCO <sub>3</sub>	2–3		
4	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2–3		

### 4.3.6 Nastajanje plinov v vampu

Med prebavnimi procesi v predželodcih nastajajo tudi plini (med njimi največ  $\text{CO}_2$  in  $\text{CH}_4$ , v sledovih pa tudi  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$  in  $\text{CO}$ ), ki postopoma prehajajo na površino ingesta in se spojijo v plinsko atmosfero vampa. Ob normalnem obroku in normalnem stanju živali se vsi nastali plini odstranjujejo iz vampa z riganjem (*ructus*). V enem dnevu lahko v predželodcih goveda nastane do 500 litrov plina oziroma celo 50 litrov na uro.



#### a) Material:

- Sveža vampova vsebina (shranjena v termos steklenici), vodna kopel (segreta na 37–39 °C), raztopina glukoze snkc 0,09 mol/L (16 g/L), Erlenmeyerjeva steklenica s perforiranim zamaškom, sistem gumijastih in steklenih cevk, stojalo s prižemami, graduirana epruveta ali menzura.

#### b) Postopek:

1. Steklenico napolnimo z 10 ml vampovega soka, dodamo 1 ml raztopine glukoze in dobro premešamo.
2. Steklenico zamašimo, postavimo v termostatsko kopel in s sistemom gumijastih in steklenih cevk povežemo z epruveto.

#### c) Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo poskusa!
2. Opazujte nastanek plinov in izmerite njihov volumen v določenem časovnem obdobju!

### 4.3.7 Opazovanje vampovih bakterij in protozojev

V predželodcih prežvekovalcev se nahajajo številne bakterije, protozoi in glivice, ki se tu začno naseljevati že kmalu po rojstvu, vendar se njihova sestava in število ustali šele pri zrelih živalih. Vsa mikrobiontska gmota se v predželodcih nahaja v okolju z optimalno temperaturo, pH ter zadostno količino vode in hranilnih snovi za njihovo rast in razmnoževanje. V neugodnih življenjskih razmerah bakterije in protozoi hitro propadejo. Mikrobionti so proizvajalci, predelovalci in potrošniki hranilnih snovi, po odmrtnju pa so vir hranilnih snovi za gostitelja.

V predželodcih odraslih prežvekovalcev se nahaja okoli 30 rodov **bakterij (mikroflora)**, ki so večinoma anaerobi. Bakterije najpogosteje klasificiramo glede na substrat, ki ga razgrajujejo, npr.:

- celulolitične (*Bacterioides succigenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*),
- hemicelulolitične (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacterioides ruminicola*),
- pektinolitične (*Bacterioides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*),
- amilolitične (*Bacterioides amilofilus*, *Streptococcus bovis*) in
- proteolitične (*Bacterioides amilofilus*, *Bacterioides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*) ter
- bakterije, ki izkoriščajo sladkorje (saharolitične) in maščobe (lipolitične).

Glede na končne produkte, ki jih porabijo gostitelj ali druge vrste mikrobov, pa jih delimo na proizvajalke amonijaka, metana in vitaminov. Znotraj teh skupin obstajajo številni rodovi in vrste. Skupno število bakterij znaša  $15\text{--}80 \times 10^9$  v ml vampove tekočine (oz.  $10^5\text{--}10^{11}$  v g vampove vsebine).

**Mikrofavno** v predželodcih predstavljajo različne vrste **protozojev**. Najpogostejši so predstavniki podrazredov Entodiniomorfi in *Holotricha* (rodova *Isotricha* in *Dasytricha*). Ti razgrajujejo predvsem celulozo, škrob in nekatere sladkorje, regulirajo procese fermentacije v vampu, proizvajajo živalske beljakovine (iz rastlinskih in bakterijskih), s svojim gibanjem pa rahljajo, mešajo in drobijo vsebino predželodcev. Njihovo število znaša nekaj milijonov v ml vampove tekočine (oz.  $10^4\text{--}10^6$  v g vampove vsebine).

V predželodcih prežvekovalcev se nahajajo tudi nekatere vrste glivic, predvsem iz rodov *Candida*, *Trichospora* in *Rhodotorula*. S porabo kisika omogočajo nastanek anaerobnih razmer v vampovi vsebini, iz enostavnih dušičnih spojin pa sintetizirajo aminokislino. Njihovo število je približno  $10^2\text{--}10^4$  v g vampove vsebine).

#### A) Opazovanje protozojev

Protozoje lahko opazujemo na več načinov.

- **V svežem vampovem soku** opazujemo protozoje tako, da na predmetnico kanemo kapljico tekoče vampove vsebine in jo pokrijemo. Pod mikroskopom lahko vidimo intenzivno gibanje protozojev, vendar ti zaradi neugodnih razmer (prisotnost kisika in nizka temperatura) hitro propadejo.
- Protozoje v vampovi vsebini lahko fiksiramo s formalinom in shranimo kot **trajni biološki preparat**, v katerem lahko opazujemo njihovo obliko ali število.

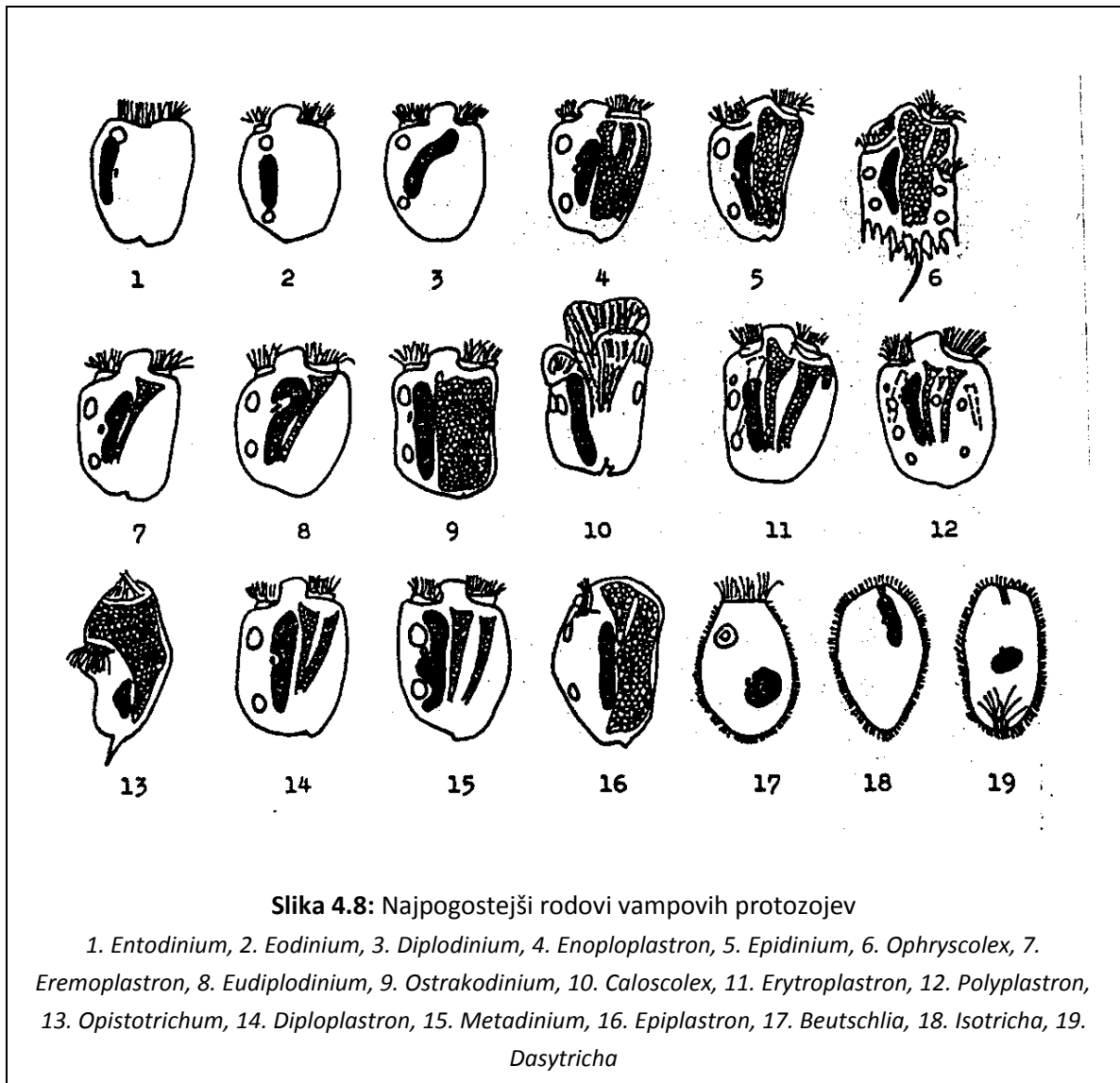
##### a) Material:

- Vampova vsebina, 10 % raztopine formalina, Erlenmeyerjeva bučka, pipete, predmetnice in pokrovnice, kapalke ter mikroskop.

**b) Postopek:**

Zmešamo enaka dela vampove tekočine in 10 % raztopine formalina. Tako nastane 5 % raztopina formalina, v kateri protozoji ostanejo konzervirani. Za opazovanje tako fiksiranih protozojev zadošča, da damo na predmetno steklo kapljico fiksirane vampove vsebine, jo pokrijemo in opazujemo.

- Kadar želimo protozoje klasificirati, jih opazujemo v **obarvanih preparatih**. Pri tem posebej obarvamo jedro in posebej telesni skelet.



**a) Material:**

- ledocetna kislina, destilirana voda, karmin rdeče, cinkov klorid ( $ZnCl_2$ ), kalijev jodid (KJ), jod (J), lesena ali steklena palčka, predmetna in pokrovna stekelca, plinski gorilnik, mikroskop.

**b) Postopek:**

Najprej pripravimo raztopino kislega karmina za barvanje jeder. Zmešamo 45 ml ledocetne kisline in 55 ml destilirane vode. V mešanici raztopimo 0,5 g karmina in filtriramo. Na predmetno steklo kanemo po eno kapljico vampovega soka in kislega karmina, ju zmešamo in pokrijemo. Nato predmetnico trikrat potegnemo nad plamenom, da tekočina zavre, ohladimo in opazujemo pod mikroskopom.

**B) Opazovanje bakterij**

Bakterije lahko opazujemo v razmazu vampove vsebine, obarvanem po Gramu ali po drugih metodah, ki se uporabljajo v mikrobiologiji.

**Naloge:**

1. Oglejte si preparate bakterij in protozojev pod mikroskopom!
2. S pomočjo slike 4.8 določite, katerim vrstam pripadajo protozoji v preparatu!



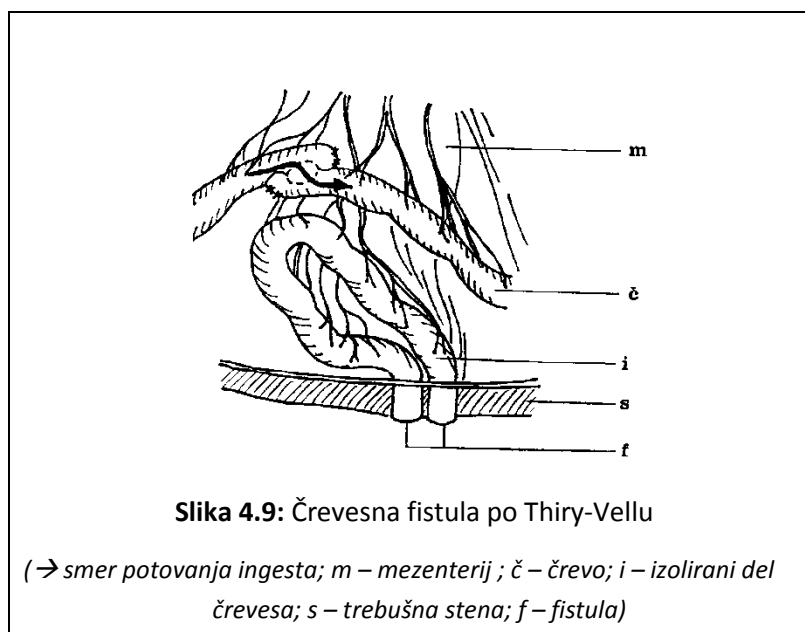
## 4.4 PREBAVA V ČREVESU

Vsebina želodca prehaja v tanko črevo, kjer poteka dokončna encimska prebava hranilnih snovi in njihova absorpcija. Črevesni gibi omogočajo mešanje hrane s prebavnimi sokovi in premikanje himusa v aboralni smeri.

### 4.4.1 Metode zbiranja in proučevanja izločanja črevesnega in pankreasnega soka ter žolča

**Črevesni sok** iz kateregakoli dela črevesa lahko pridobivamo s pomočjo črevesnih fistul. Vse fistule izvajamo pri živalih v narkozi in strogo aseptično.

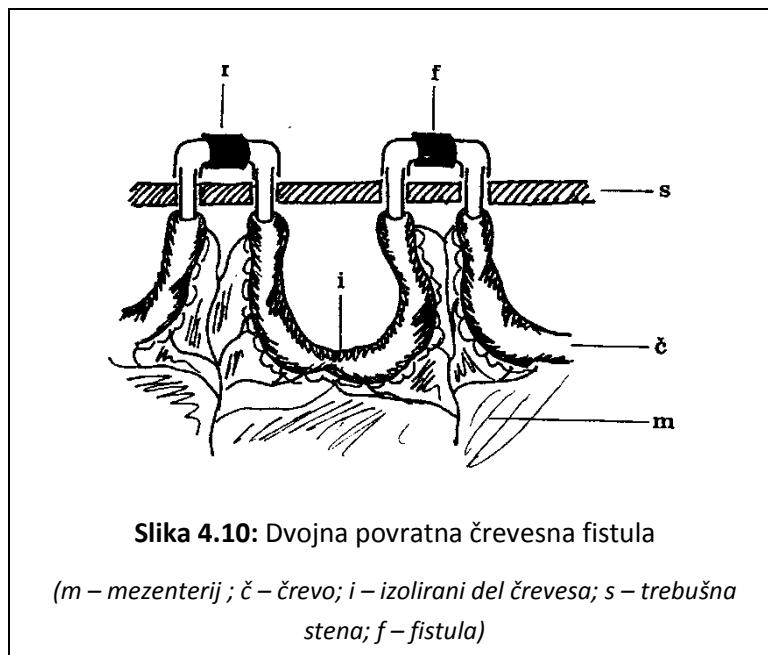
- **Fistulo po Thiry-Vellu** (slika 4.9) pripravimo tako, da del črevesa (približno 20 do 50 cm) izoliramo z ohranjenim mezenterijem; oba konca črevesa prišijemo na trebušno steno tako, da komunicirata z zunanostjo, v odprtini pa namestimo primerno kanilo. Kontinuiteto ostalega črevesa ohranimo tako, da prerezana dela, izmed katerih smo izolirali odsek črevesa, zašijemo skupaj.



- Še uporabnejša je modifikacija črevesne fistule z **dvojno povratno fistulo** (slika 4.10). Pri tej se, kadar ne izvajamo poskusa, izolirani segment črevesa poveže z drugimi deli črevesa, kar omogoča boljšo sekretorno in motorično aktivnost fistulirane vijuge.

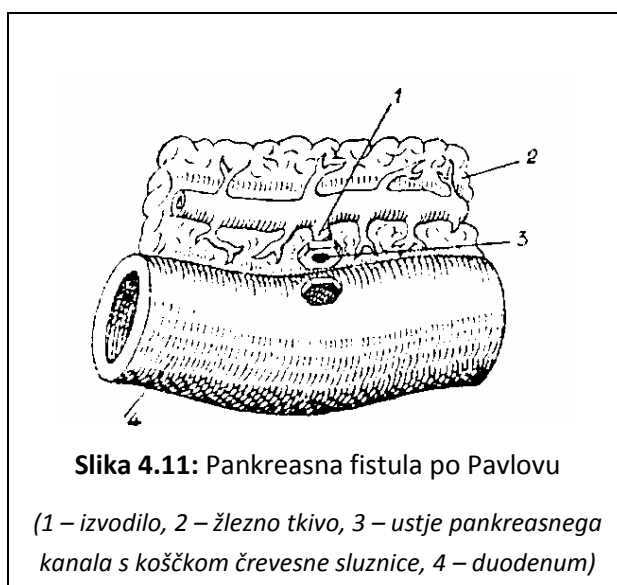
**Pankreasni sok** se pridobiva z začasno ali trajno fistulo izvodila pankreasa.

- **Začasno fistulo** dobimo z uvajanjem kanile v prerezano izvodilo pankreasa, prosti del pa se pritrdi na kožo na površini trebuha. Ta fistula je začasna, ker pankreasno kanal s katetrom naglo nekrotizira.
- **Stalno fistulo (po Pavlovu, slika 4.11)** se pripravi tako, da se izreže del duodenuma na mestu, kjer se izliva izvodilo pankreasa. Sluznico z izvodilom se transplantira na kožo trebuha, odprtino v črevesu pa se zašije. Danes obstaja več uspešnih modifikacij te metode, s katerimi se izognemo izgubam pankreasnega soka, ki sicer živali s fistulo povzročajo težke prebavne motnje.



Tudi **žolč** lahko zbiramo s fistulami. Pri nepopolnih fistulah naredimo odprtino na žolčniku, njene robove pa povežemo s kožo trebuha.

- **Popolno fistulo *ductusa choledocusa* (po Pavlovu)** naredimo tako, da izrežemo papilo žolčnega kanala z okolno sluznico duodenuma in jo premaknemo na površino kože.
- S **fistulo po Thomasu** (ki se uporablja tudi za pankreas) rešimo problem stalne izgube žolča na ta način, da naredimo fistulo duodenuma nasproti papile žolčnega kanala in skozi jo po potrebi uvedemo kateter v žolčno izvodilo.



### 4.4.2 Emulgiranje maščob pod vplivom žolča

Pri prebavi maščob v tankem črevesu imajo izreden pomen žolčne kisline. Te znižujejo površinsko napetost maščob in omogočajo njihovo emulgiranje. Sodelujejo tudi pri resorpciji maščob, holesterola in drugih maščobnih snovi ter vitaminov, topnih v maščobi. Poleg tega tudi aktivirajo pankreasno lipazo ter pospešujejo gibanje črevesa in izločanje žolča.

**a) Material:**

- Žolč klavnih živali, rastlinsko olje, destilirana voda, epruvete, lijaki, filtrirni papir.

**b) Postopek:**

1. V prvo epruveto odpipetiramo po 1 ml žolča in olja ter dobro premešamo.
2. V drugo epruveto odpipetiramo po 1 ml vode in olja in dobro premešamo.
3. Vsebino obeh epruvet prelijemo v drugi dve epruveti skozi lij s filtrirnim papirjem.

**c) Naloge:**

1. Shematično prikažite izvedbo poskusa!
2. Opišite vsebino obeh epruvet s filtratom!

### 4.4.3 Reakcija na žolčna barvila (po Gmelinu)

Z reakcijo po Gmelinu lahko prikažemo različne oksidacijske produkte žolčnih barvil (bilirubin, biliverdin in produkte njune razgradnje). Ti nastanejo ob katabolizmu hemoglobina, ki poteka v kostnem mozgu, vranici in jetrih. Ob krvavitvah v tkivo lahko nastanejo tudi kjerkoli v telesu. Bilirubin se v stiku z dušično kislino oksidira v coni, kjer se stikata žolč in  $\text{HNO}_3$ , pri čemer nastanejo raznobarvni derivati.

**a) Material:**

- Epruvete, pipete (5 ml), razredčen žolč klavnih živali, koncentrirana dušikova(V) kislina ( $\text{HNO}_3$ ).

**b) Postopek:**

V epruveto odmerimo 2 do 3 ml dušikove kisline in dodamo enako količino žolča (ali druge tekočine, ki jo pregledujemo na prisotnost žolčnih barvil). Če so prisotna žolčna barvila, se na mestu stika obeh tekočin pojavijo prstani različnih barv, ki so razvrščeni od tekočine proti kislini v naslednjem zaporedju: zeleni, modri, vijoličasti, rdeči in rumeni. Rdeči prstan izvira iz bilirubina, zeleni iz njegovega oksidacijskega produkta biliverdina, modri iz bilifuscina in rumeni iz holotelina, ki je končni oksidacijski produkt bilirubina.

**c) Naloge:**

Shematično prikažite izvedbo in rezultate poskusa!

#### 4.4.4 Reakcija na žolčne kisline (po Pettenhoferju)

Z reakcijo po Pettenhoferju dokazujemo prisotnost žolčnih kislin (steroidne spojine, derivati holanske kisline – holna, dezoksiholna, litholna in hiodezoksiholna kislina) v različnih tekočinah. Pri tej reakciji z delovanjem koncentrirane žveplove kisline na saharozo nastane najprej oksimetil furfural, ki z žolčnimi kisljinami da kompleks škrlatno rdeče barve.

##### a) Material:

- Razredčen žolč klavnih živali, raztopina saharoze 0,3 mol/L (100 g/L), koncentrirana žveplova(VI) kislina ( $H_2SO_4$ ), epruvete, pipete.

##### b) Postopek:

V epruveto damo 3 do 4 ml žolča in dodamo 10 kapljic saharoze. Dolijemo žveplovo kislino za polovico volumna testne tekočine. Na stični ploskvi obeh tekočin se pojavi škrlatno rdeč prstan, ki dokazuje prisotnost žolčnih kislin. S pazljivim sprotnim ohlajanjem se vsebina vse epruvete obarva rdeče. Če pa temperatura vsebine v epruveti preseže 70 °C, vsebina poogleni in zato postane črna.

##### c) Naloge:

- Shematično prikažite izvedbo poskusa!

#### 4.4.5 Vloga lipaze in žolča pri prebavi maščob

Pankreasni sok izloča eksokrini del trebušne slinavke, endokrini del (Langerhansovi otočki) pa izločajo hormona insulin in glukagon. Vsaka eksokrina celica pankreasa lahko izloča vse encime. Najpomembnejši encimi pankreasnega soka so amilaza (škrob in glikogen razgradi do maltoze), maltaza (ali  $\alpha$  glukozidaza; maltozo razgradi na 2 molekuli glukoze), pankreasna lipaza (maščobe cepi na digliceride, monogliceride, maščobne kisline in glicerol), fosfatidaze (ali lecitinaze, npr. A in B; od molekul fosfatidov cepita maščobne kisline), proteolitični fermenti tripsinogen (ki ga enterokinaza aktivira v tripsin), himotripsinogen (ki ga tripsin aktivira v himotripsin) in peptidaze (pankreasni erepsin) ter polinukleotidaze (ki razgrajujejo nukleinske kisline). Prebava maščob in olj v tankem črevesu poteka pod vplivom encima lipaze. Za optimalno delovanje encima morajo biti maščobe predhodno emulgirane, kar omogočajo žolčne soli, ki se nahajajo v žolču. Lipaza hidrolizira maščobe do digliceridov, monogliceridov in maščobnih kislin.

#### A) Prikaz delovanja lipaze in žolčnih soli pri prebavi maščob

Delovanje lipaze pri prebavi maščob lahko prikažemo z računalniškim programom PhysioEx. Virtualni laboratorij odpremo z izbiro poglavja **Kemični in fiziološki procesi prebave (*Chemical and Physical Processes of Digestion*)** v glavnem meniju, kjer v podmeniju **Experiment** izberemo poglavje **Lipase**. Virtualni laboratorij za izvedbo poskusa je opisan v vaji 4.1.3A. Pri tem poskusu je v omarici pH-meter, s katerim ob koncu inkubacije izmerimo elektrokemično reakcijo vzorcev. Maščobne kisline so organske kisline, ki povzročijo padec pH v testni raztopini, kar omogoča enostavno dokazovanje procesov in rezultatov prebave maščob.

##### a) Priprava in inkubacija vzorcev:

1. V stojalo inkubacijske enote namestimo 6 epruvet.
2. Po navodilih, podanih v spodnji tabeli, napolnimo epruvete z reagenti.
3. Temperaturo inkubacije nastavimo na 37 °C in čas inkubacije na 60 min (inkubacija v virtualnem laboratoriju traja 60 s!).

4. Izberemo tipko **Incubate** za pričetek inkubacije. Inkubacijska enota bo začela mešati vsebino epruvet. Ko je inkubacija končana, se stojalo z epruvetami dvigne iz kopeli in odprejo se vrata omarice za analizo.

**b) Analiza vzorcev:**

V omarici za analizo je pH-meter. Testno epruveto premaknemo v nosilec pH-metra in izberemo ukaz **Izmeri pH (Measure pH)**. Elektroda se potopi v testni vzorec, izmeri pH in se nato dvigne. pH vzorca odčitamo na prikazu instrumenta.

1. Izberemo 1. epruveto v stojalu (spremeni se v miniaturno epruveto, nagnjeno v levo) in jo premaknemo v ležišče pH-metra.
2. Izberemo tipko **Measure pH** in odčitamo pH vzorca.
3. Epruveto vrnemo v inkubacijsko enoto in ponovimo meritve z ostalimi epruvetami.

**c) Naloge:**

1. Rezultate meritev vnesite v spodnjo tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Primerjajte rezultate meritev v 1. in 2. epruveti in jih razložite!
  - Kateri pH kaže na največjo aktivnost lipaze?
  - Ali bi lipaza teoretično lahko delovala v ustih in želodcu? Razložite!

	Številka epruvete					
Reagenti	1	2	3	4	5	6
encim	lipaza	lipaza	lipaza	dest. voda	lipaza	lipaza
žolč	+	dest. voda	+	+	+	+
substrat	olje	olje	dest. voda	olje	olje	olje
pufer [pH]	7,0	7,0	9,0	7,0	2,0	9,0
inkubacija	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
pH po inkubaciji						

**B) Razgradnja maščob pod vplivom pankreasnih lipaz**

**a) Material:**

- Zdrobljeno pankreasno tkivo goveda, rastlinsko olje, raztopina  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 mol/L (20 g/L), alkoholna raztopina fenolftaleina, Erlenmeyerjeva bučka, pipete in vodna kopel (segreta na 37–39 °C).

**b) Postopek:**

1. V Erlenmeyerjevo bučko vlijemo nekaj ml rastlinskega olja.
2. Dodamo 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 kapljico fenolftaleina (obarva raztopino rdeče) in nekaj ml zdrobljenega pankreasnega tkiva.
3. Vsebino erlenmajerice dobro premešamo in damo v vodno kopel. Kmalu opazimo razbarvanje vsebine.

**c) Naloge:**

1. Shematično ponazorite izvedbo vaje!
2. Razložite vzroke za spremembo obarvanja vsebine!

#### 4.4.6 Opazovanje črevesnih resic

Črevesne resice se nahajajo na vsej sluznici tankega črevesa in štrlijo približno 1 mm v lumen črevesa. V njih se nahajajo centralni limfni sinus, arterija in vena, kar omogoča optimalno resorpcijo hranilnih snovi (aktivni transport, difuzija). Absorpcijsko površino črevesa poleg črevesnih resic povečujejo še sluznične gube in mikrovili enterocitov.

**a) Material:**

- Odrezek sluznice duodenuma budre, stereo lupa, petrijevka, fiziološka raztopina, košček plute, igle.

**b) Postopek:**

Košček duodenuma z iglami pritrdimo na pluto in potopimo v petrijevko s fiziološko raztopino in opazujemo preparat pod stereo lupo.

**c) Naloge:**

- Narišite črevesne resice!

#### 4.4.7 Opazovanje gibanja izoliranega ileuma budre

Organi hladnokrvnih in toplokrvnih živali ohranijo nekatere svoje funkcije tudi še po izolaciji iz organizma. Črevo budre ohrani svojo kontraktilno lastnost, če se nahaja v oksigenirani hranilni raztopini s temperaturo 37 do 40 °C.

Črevo ima, podobno kot drugi deli prebavil, svojo notranjo inervacijo in inervacijo iz vegetativnega živčnega sistema. Notranjo inervacijo predstavljata **Plexus submucosus s. Meissneri** (v *muscularis mucosae*) in **Plexus myentericus s. Auerbachi** (v mišičnem sloju med cirkularno in longitudinalno muskulaturo). Zunanja inervacija izhaja iz parasimpatikusa (*n. vagus*) in simpatikusa (*n. splanchnicus*). Draženje vagusa spodbuja motoriko črevesja, draženje simpatikusa pa jo zavira.

Če v lumnu izoliranega črevesa povečamo pritisk, nastopijo značilni kontrakcijski valovi. Gre za refleksno reakcijo, ki poteka po avtonomnem inervacijskem sistemu. Ob raztezanju črevesne stene se zaradi povečanega notranjega pritiska vzdražijo mehanoreceptorji v sluznici, ki so povezani z Meissnerjevim plexusom; po anastomozah se refleksi prenese do Auerbachovega plexusa in njegovih motoričnih vlaken, nato pa do muskulature v steni črevesa, kar vodi do gibanja črevesa.

**a) Material:**

- Morski prašiček, operacijski pribor, vodna kopel (s kontaktnim termometrom, mešalcem in grelcem), Tyrodejeva raztopina, kisik, kimograf (prirejen za registracijo krčenj črevesa).

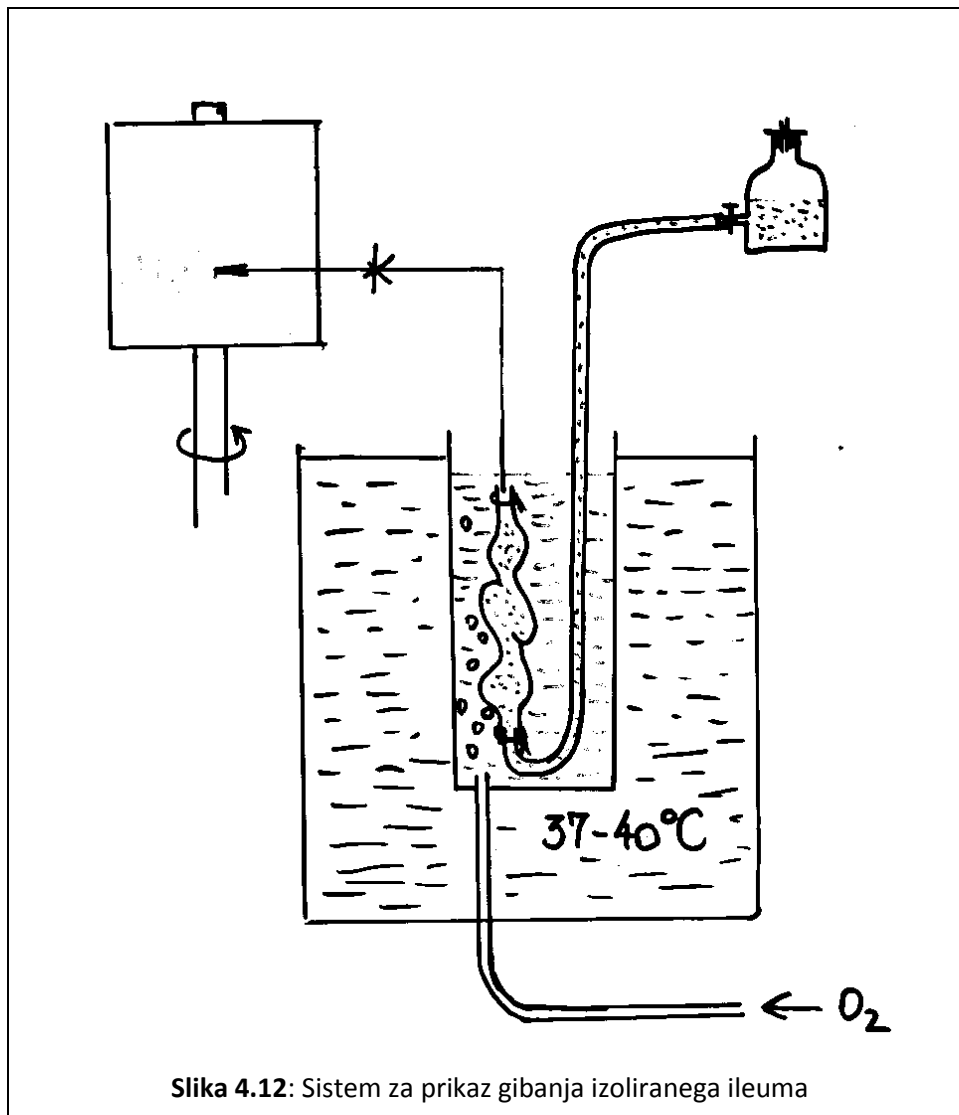
**b) Postopek:**

1. Morskega prašička evtanaziramo, mu prerežemo kožo in mišice trebušne stene in poiščemo ileum. Temu na oralnem delu s kirurško iglo namestimo nit, nato pa izrežemo približno 5 cm dolg košček.
2. V aboralni del ileuma pritrdimo stekleno cevko, ki je povezana s posodo s Tyrodejevo raztopino.
3. Črevo namestimo v posodo s Tyrodejevo raztopino, ki je povezana z dotokom kisika in nameščena v termostatski kopeli.

4. Iz steklenice spustimo v črevo Tyrodejevo raztopino tako, da se črevo napolni in raztegne, ter zavežemo ligaturo na oralnem delu tako, da tekočina ne izhaja iz črevesa. Oralni del ileuma povežemo s pisalom kimografa. Ileum se ritmično krči in iztiska tekočino, ki ob relaksaciji prodira v lumen, nazaj v dovodni sistem. Ob tem spreminja svojo dolžino, kar vidimo kot zapis krivulje na kimografskem bobnu.

c) Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo poskusa!
2. Razložite vzroke za nastale spremembe!

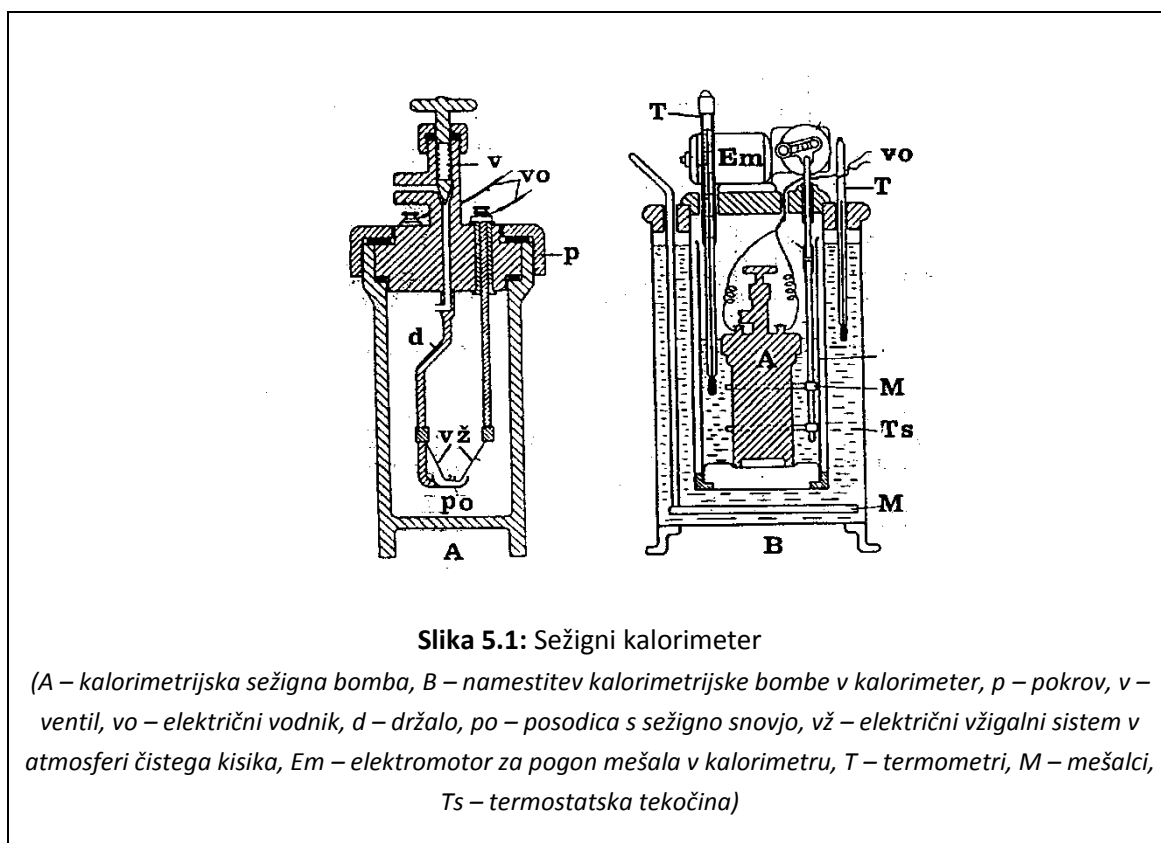


## 5 ENERGETSKI METABOLIZEM IN TERMOREGULACIJA

V telesu nastaja energija pri oksidacijskih procesih. Energetske snovi prihajajo v telo s hrano, kisik pa z vdihanim zrakom. Pri oksidacijskih procesih nastaja energija, ki se skladišči v energetsko bogatih spojinah, sprošča kot toplota ali porablja pri delu. Poleg tega nastajajo tudi ogljikov dioksid, voda in drugi končni, energetsko brezvredni produkti razgradnje.

### 5.1 MERJENJE ENERGETSKE VREDNOSTI HRANILNIH SNOVI

Hranilne (in tudi druge) snovi imajo določeno energetsko vrednost, ki jo organizmi lahko uporabljajo za svoje oksidacijske procese. Energetsko vrednost snovi lahko izmerimo s sežigom v kalorimetru.



Kalorimeter, ki ga prikazuje slika 5.1, je sestavljen iz masivne kovinske bombe, v kateri se v kisikovi atmosferi nahajata vžigalni sistem in snov, kateri merimo energetsko vrednost. Bomba je potopljena v drugo kovinsko posodo, napolnjeno z vodo. Iz razlike v temperaturi vode pred sežigom in po njem lahko izmerimo energetsko (kalorično) vrednost snovi.

Po definiciji za kalorijo (ki je za nekatere fiziologe primernejša za izražanje energetske vrednosti kot po SI določeni joule) je 1 kalorija (cal) tista količina toplote, ki segreje 1 g vode za 1 °C, tj. od



14,5 na 15,5 °C. Pogosto se kot enote uporabljajo kilokalorije (gl. poglavje 1.1.3). Energetsko vrednost nekaterih snovi prikazuje tabela 5.1.

Čeprav obstajajo razlike med potekom biološke oksidacije hrane v organizmu in oksidacije v kalorimetrični bombi, pa to ne vpliva na termodinamične procese, saj je po Hessovem zakonu osvobodena energija pri kateremkoli oksidacijskem procesu odvisna od substanc, ki reagirajo, in končnih produktov, ki nastanejo, ne pa od okolja in vmesnih reakcij, preko katerih reakcija teče. Zato so, kot je prikazano v tabeli 5.2, energetske vrednosti hranilnih snovi (razen beljakovin) enake pri meritvah v fizioloških razmerah in v kalorimetrični bombi. Pri beljakovinah prihaja do razlik predvsem na račun uree in drugih produktov metabolizma beljakovin, ki se izločajo iz organizma, ne da bi se dokončno oksidirali.

**Tabela 5.1:** Energetska vrednost nekaterih hranilnih snovi in goriv

<b>Snov</b>	<b>Energetska vrednost [kJ/g]</b>
glukoza	15,65
saharoza	16,58
škrob	17,58
proteini	23,86
maščobe	38,93–39,77
sečnina	10,59
metan	55,25
vodik	141,90
nafta	41,86
premog	14,65–25,12
les	12,55 –14,65

**Tabela 5.2:** Povprečne energetske vrednosti za nekatere vrste hranilnih snovi pri oksidaciji v kalorimetru in v živalskem organizmu

<b>Snov (1 g)</b>	<b>Energetska vrednost [kJ]</b>	
	<b>v kalorimetru</b>	<b>v organizmu</b>
proteini	23,65	17,16
ogljikovi hidrati	17,2	17,2
maščobe	39,56	39,56

## 5.2 KALORIMETRIJA ŽIVIH ORGANIZMOV

Intenzivnost energetskega metabolizma se lahko določi z merjenjem toplote, ki se iz organizma sprošča s sevanjem, kondukcijo, konvekcijo in evaporacijo (direktna kalorimetrija) ali z izračunom produkcije toplote iz razmerja respiratornih plinov (indirektna kalorimetrija).

Toplota se iz telesa oddaja po fizikalnih zakonih – z radiacijo, konvekcijo, kondukcijo in evaporacijo.

- **Kondukcija** je neposreden prenos toplote s predmeta na predmet zaradi razlik v temperaturi (npr. prenos toplote na zemljo, hladna tla ali v vodo).
- **Radiacija** (sevanje) je oddajanje toplote v obliki elektromagnetnih valov.
- **Konvekcija** je oddajanje toplote v zrak okoli telesa. Ogreti zrak okrog telesa se dviga, nadomešča ga hladnejši, zato nastajajo okoli organizma tokovi zraka, ki odnašajo toploto. Konvekcijo zmanjšujejo dlaka oziroma oblačila, pospešuje pa jo veter.
- **Evaporacija** (izparevanje) je oddajanje toplotne energije na račun izhlapevanja vode s površine telesa. Za izparitev 1 litra znoja se porabi 2427,9 kJ. Ločimo nevidno perspiracijo, to je izparevanje majhnih količin vode, ki izpari takoj, ko se izloči, ter znojenje, ki se pojavi pri višjih temperaturah okolja.

Toplota se oddaja tudi s površine dihal z izparevanjem.

### 5.2.1 Direktna kalorimetrija

V praksi je direktna kalorimetrija zapletena in težko izvedljiva, saj mora fiziološki kalorimeter zadovoljiti naslednjim zahtevam:

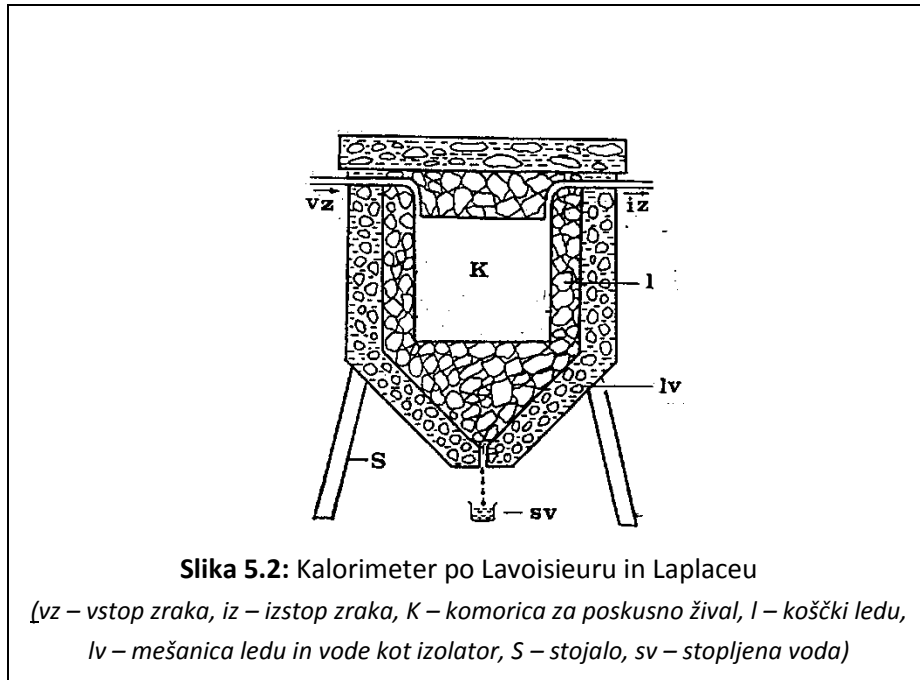
- možnost merjenja oddane toplote pri različnih temperaturah okolja,
- ne sme biti akumulacije CO<sub>2</sub> in
- omogočeno mora biti merjenje vpliva hrane in dela oziroma gibanja na metabolične procese.

Prve poskuse v zvezi z merjenjem produkcije toplotne energije pri živalih so opravili že v 18. stoletju (Lavoisier in Laplace, 1779). Princip je temeljil na merjenju količine vode, nastale ob topljenju ledu okoli posode, v kateri je bila poskusna žival. Ta kalorimeter ima omejeno uporabo, ker meri oddajo toplote ob temperaturi okolja okoli 0 °C. Z njim lahko izračunamo količino toplote, ki jo odda žival na osnovi fizikalnih zakonitosti. To sta specifična toplota in specifična talilna toplota.

**Specifična toplota** je tista količina toplote, ki jo je potrebno dovajati nekemu telesu ali snovi, da se njegova temperatura spremeni za 1 °C. **Specifična talilna toplota** pa je količina toplote, ki jo moramo na tališče segretemu telesu dovajati, da se stali. Specifična toplota ledu je 2,093 kJ/kgK, specifična talilna toplota ledu pa je 334,880 kJ/kg. Količina toplote, ki se porabi za taljenje ledu, je vsota specifične toplote in specifične talilne toplote. Izračun nam prikazuje enačba:

$$Q = m_l c dT + m_l q_t$$

(*Q* – količina toplote, *m<sub>l</sub>* – masa ledu, *c* – specifična toplota (2,09 kJ), *q<sub>t</sub>* – specifična talilna toplota (334,88 kJ/kg), *dT* – temperatura ledu v okolici poskusne živali (oziroma razlika med temperaturo ledu in 0 °C).



Pogoje za uspešno direktno kalorimetrijo, naštet v prvem odstavku, najbolje izpolnjujejo adiabatni in gradientni kalorimetri.

- Osnova za **adiabatni kalorimeter** je toplotno izoliran prostor. Toplota, ki jo odda organizem s sevanjem, se zbira tako, da ogreva vodo, ki kroži znotraj prostora. Iz razlike v temperaturi vode pred vstopom v kalorimeter in po izstopu iz njega lahko izračunamo količino toplote, ki jo odda organizem. Poleg tega zbiramo izparjeno vodo v posebni posodi s  $H_2SO_4$ , v katero se zaradi higroskopičnosti voda veže. Pri tovrstnih meritvah je potrebno upoštevati tudi spreminjanje telesne temperature organizma. Ker je ta oblika direktne kalorimetrije tehnično precej zahtevna in tudi draga, se redkeje uporablja.
- Delovanje **gradientnega kalorimetra** temelji na merjenju oddaje toplote iz termalnega vira, zaprtega v oklep in obdanega s plastjo, imenovano gradientna plast, ki meri tok toplote. Ta je narejena iz konstantana (zlitina bakra, niklja železa in mangana), vpletene skozi izolatorsko plast. Če ta plast v celoti in popolno pokriva komoro, registrira celotno toploto, oddano iz notranjosti komore, ne glede na položaj živali, velikost in obliko komore. Toplotne izgube z ventilacijo in respiracijo se merijo z merilci toplotne izmenjave. Razlika v temperaturi plasti, njena debelina in toplotna kondukcija so poznani, izračunana vrednost je tok toplote, izražen v J/s. Ti kalorimetri so enostavnejši kot adiabatni, rezultate dobimo hitreje, so pa prav tako zanesljivi.

**Naloga:**

S kalorimetrom po Lavoisieru in Laplaceu izračunajte količino oddane toplote pri modelu poskusne živali na kilogram telesne mase!

## 5.2.2 Indirektna kalorimetrija

### A) Metode indirektne kalorimetrije

Ker živalski organizem zagotavlja vse svoje energetske potrebe iz oksidacije, se obseg energetskega metabolizma lahko določi iz razmerja izmenjave respiratornih plinov. Količino energije, ki se sprosti ob oksidaciji hranilnih snovi v organizmu, lahko merimo z ugotavljanjem porabe kisika in nastajanjem ogljikovega dioksida v določenem času. Obstajajo številne tehnike in metode merjenja, ki se izvajajo v komorah, v katere namestimo žival, ali s pomočjo maske oziroma trahealne kanile, povezane z napravo za merjenje. Analiza plinov se opravi kemijsko, volumetrijsko ali manometrijsko.

Metode indirektna respiratorne kalorimetrije so enostavnejše kot direktne in se na široko uporabljajo pri vseh vrstah živali in pri človeku, z Warburgovim aparatom pa celo pri tkivih, celicah ali celičnih organelih.

Najbolj znane metode so:

- **Komora po Lavoisierju** se lahko uporablja predvsem za manjše živali in krajše poskuse, ker poraba O<sub>2</sub> in nastanek CO<sub>2</sub> začne motiti normalne funkcije organizma.
- **Metode zaprtega kroga:**
  - Komora po Regnaultu in Reisetu** (1849) je zaprt prostor, v katerem se nahaja poskusna žival ali oseba. Kisik se v komoro dodaja iz rezervoarja in se meri njegova poraba, CO<sub>2</sub> in voda iz izdihanega zraka pa se izločita na adsorbentno snov.
    - Atwater-Rosa-Benedictov** respiratorni kalorimeter se uporablja za merjenje energetskega metabolizma pri ljudeh in je videti kot opremljena soba.
    - Benedict-Rothov spirometer** se prav tako uporablja za meritve pri ljudeh. Kisik se skozi masko (ali skozi trahealno kanilo pri živalih) vdihuje iz spirometra, sistem zaklopk pa usmerja izdihani zrak do adsorbensa za CO<sub>2</sub>. Poskus traja 6 minut, rezultati pa se preračunajo na eno uro.
- Pri **metodah odprtega kroga** se zrak ali kisik vdihuje iz atmosfere ali tanka, izdihani zrak pa se analizira in izpusti v atmosfero. V ta namen se uporablja *Douglasova vreča*, ki se namesti na hrbet poskusne osebe ali živali, v njej pa zbiramo zrak v različnih fizioloških razmerah. Vzorec zraka iz vreče lahko analiziramo na vsebnost kisika in ogljikovega dioksida in iz razlik med sestavo atmosferskega zraka in zraka v vreči izračunamo porabo O<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>.

### B) Računanje energetskega metabolizma pri indirektni kalorimetriji (na osnovi respiratornega količnika)

Kemične reakcije energetskega metabolizma so stehiometrijske. To pomeni, da substrat in O<sub>2</sub> reagirata v določenem razmerju, pri čemer se sprošča energija in nastanejo znane količine vode in CO<sub>2</sub>. Na tej osnovi lahko izvajamo kalorimetrijo živih organizmov z merjenjem porabe O<sub>2</sub> in produkcije CO<sub>2</sub>. Razmerje med izločenim CO<sub>2</sub> in porabljenim O<sub>2</sub> v določeni časovni enoti imenujemo respiratorni količnik (RQ):

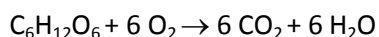
$$RQ = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$$

( $V_{CO_2}$  – volumen nastalega ogljikovega dioksida,  $V_{O_2}$  – volumen porabljenega kisika)

RQ nam omogoča, da lahko ugotovimo delež ogljikovih hidratov in maščob, porabljenih za tvorbo določene količine energije. Na osnovi izmerjene količine dušika v urinu lahko ugotovimo tudi delež beljakovin.

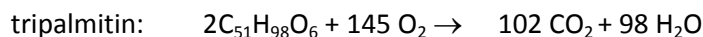
Če *in vitro* zažgemo hranilno snov v atmosferi čistega kisika, se respiratorni količnik razlikuje glede na vrsto hranilne snovi. Enako se zgodi tudi v organizmu. RQ nam torej pokaže, katere snovi so se oksidirale v organizmu. Ker se nikoli ne oksidira ena sama snov, je RQ dejansko rezultat različnih kemičnih procesov. Če bi v organizmu izgorevali samo ogljikovi hidrati, bi bil  $RQ = 1$ , če bi izgorevale samo maščobe, pa bi bil  $RQ = 0,7$ . Ker ti dve snovi izgorevata hkrati, dobimo vrednosti RQ od 0,7 do 1. Naslednji primeri prikazujejo oksidacijo hranilnih snovi.

Pri oksidaciji ogljikovih hidratov ( $C_n(H_2O)_n$ ) se ves  $O_2$  veže s C in tvori  $CO_2$ . Oksidacija glukoze poteka po enačbi:

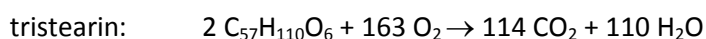


$$RQ = (6 \text{ vol. delov } CO_2) / (6 \text{ vol. delov } O_2) = 1$$

Pri oksidaciji maščob se  $O_2$  porabi za oksidacijo C in H, zato je RQ manjši od 1 (cca 0,7). Oksidacija poteka po enačbah:

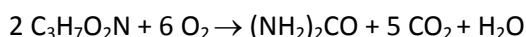


$$RQ = (102 \text{ vol. dela } CO_2) / (145 \text{ vol. delov } O_2) = 0,703$$



$$RQ = (114 \text{ vol. delov } CO_2) / (163 \text{ vol. delov } O_2) = 0,7$$

Pri oksidaciji proteinov je treba upoštevati, da se nekateri končni produkti izločijo z urinom in blatom, ne da bi se dokončno oksidirali. Oksidacijo aminokislina alanina ponazarja enačba:



$$RQ = (5 \text{ vol. delov } CO_2) / (6 \text{ vol. delov } O_2) = 0,83$$

Enake vrednosti RQ dobimo tudi pri merjenju volumna respiratornih plinov. Pri popolni oksidaciji 1 g ogljikovih hidratov se porabi 0,829 L  $O_2$  in nastane 0,828 L  $CO_2$  ( $RQ = 1$ ). Pri oksidaciji 1 g maščob se porabi 2,013 L  $O_2$ , nastane pa 1,431 L  $CO_2$  ( $RQ = 0,7$ ). Kadar oksidiramo 1 g proteinov, porabimo pri tem 0,957 L  $O_2$ , nastane pa 0,774 g  $CO_2$  ( $RQ = 0,8$ ).

Na osnovi podatkov o vrednosti RQ je iz **tabele po Lusku** (tabela 5.3) mogoče ugotoviti delež ogljikovih hidratov in maščob, ki se oksidirajo.

Tabela ne upošteva deleža beljakovin, čeprav je za natančnejše vrednotenje treba upoštevati tudi te hranilne snovi. Podatke o količini porabe kisika, tvorbi ogljikovega dioksida in energetski vrednosti procesov pri metabolizmu proteinov dobimo, če v gramih izmerjeno vrednost dušika v urinu pomnožimo z naslednjimi faktorji:

g N (v urinu)  $\times$  6,25 = količina oksidiranih proteinov,

g N (v urinu)  $\times$  4,76 = količina  $CO_2$  (L), ki nastaja pri oksidaciji proteinov,

g N (v urinu)  $\times$  5,94 = količina  $O_2$  (L), porabljen za oksidacijo proteinov,

g N (v urinu)  $\times$  110,51 = količina toplote (kJ), sproščena pri oksidaciji proteinov.

Za izračun energetskega metabolizma je pomembna tudi **kalorična vrednost kisika** ali **kalorični ekvivalent kisika**. To je količina energije, nastala pri metabolizmu posameznih hranilnih snovi, izražena v litrih porabe kisika.

**Tabela 5.3:** Določanje količine toplote, nastale pri oksidaciji hranilnih snovi (po Lusku)

RQ	Delež [%]		Kalorična vrednost kisika [kJ/L O <sub>2</sub> ]
	Ogljikovi hidrati	Maščobe	
0,70	0	100,00	19,617
0,71	1,1	98,9	19,633
0,72	4,8	95,2	19,683
0,73	8,4	91,6	19,734
0,74	12,0	88,00	19,788
0,75	15,6	84,4	19,838
0,76	19,2	80,8	19,889
0,77	22,8	77,2	19,943
0,78	26,3	73,7	19,993
0,79	29,9	70,1	20,044
0,80	33,4	66,6	20,098
0,81	36,9	63,1	20,149
0,82	40,3	59,7	20,199
0,83	43,8	56,2	20,253
0,84	47,2	52,8	20,303
0,85	50,7	49,3	20,353
0,86	54,1	45,9	20,408
0,87	57,5	42,5	20,458
0,88	60,8	39,2	20,509
0,89	64,2	35,8	20,559
0,90	67,5	32,5	20,613
0,91	70,8	29,2	20,663
0,92	74,1	25,9	20,714
0,93	77,4	22,6	20,768
0,94	80,7	19,3	20,818
0,95	84,0	16,0	20,869
0,96	87,2	12,8	20,923
0,97	90,4	9,6	20,973
0,98	93,6	6,4	21,023
0,99	96,8	3,2	21,078
1,00	100,0	0	21,128

Količina energije, ki nastane pri oksidaciji 1 L O<sub>2</sub>, je odvisna od snovi, ki se oksidira, in znaša za ogljikove hidrate 21,2 kJ, za maščobe 19,6 kJ in za beljakovine 18,8 kJ. Vrednosti za kalorične ekvivalente kisika pri oksidaciji hranilnih snovi ob različnem RQ so podane v tabeli 5.3.

Izračun kalorične vrednosti kisika pri oksidaciji ogljikovih hidratov kaže spodnji primer:

Pri oksidaciji 1 g škroba se sprošča 17,58 kJ energije, pri čemer se porabi 0,829 L kisika. Izračunajte količino energije, ki se sprosti pri porabi 1 litra kisika!

$$\begin{array}{l} 0,829 \text{ L O}_2 \dots\dots\dots 17,58 \text{ kJ} \\ \underline{1,000 \text{ L O}_2 \dots\dots\dots X \text{ kJ}} \\ X = 17,58/0,829 = \underline{21,206 \text{ kJ}} \end{array}$$

V natančnih poskusih, kjer je potrebno upoštevati tudi izgorevanje proteinov, pa postopamo po naslednjem primeru:

**Primer:**

V 1 uro trajajočem poskusu je žival izdihala 13,5 L CO<sub>2</sub>, prejela 16,0 L O<sub>2</sub> in z urinom izločila 0,5 g dušika. Izračunajte količino nastale energije in delež posameznih hranilnih snovi pri produkciji te energije!

a) Na metabolizem beljakovin odpade:

- nastanek CO<sub>2</sub>: 0,5 g N × 4,76 = 2,38 L
- poraba O<sub>2</sub>: 0,5 g N × 5,94 = 2,97 L
- sproščena E: 0,5 g N × 110,51 = 55,255 kJ

b) Na metabolizem ogljikovih hidratov in maščob odpade:

- nastanek CO<sub>2</sub>: 13,5 L – 2,38 L = 11,12 L
- poraba O<sub>2</sub>: 16 L – 2,97 L = 13,03 L

- izračun RQ: 11,12 L CO<sub>2</sub>/13,03 L O<sub>2</sub> = 0,85

Pri RQ = 0,85 je kalorična vrednost O<sub>2</sub> 20,353 kJ/L O<sub>2</sub>, delež OH 50,7 % in delež M 49,3 %.

- Količina energije (na račun OH in M):

- skupaj: 13,03 L O<sub>2</sub> × 20,353 kJ/L O<sub>2</sub> = 265,2 kJ
- na račun OH: 50,7 % od 265,2 kJ = 134,46 kJ
- na račun M: 49,3 % od 265,2 kJ = 130,74 kJ

c) Skupna količina E:

- na račun B: 55,255 kJ
- na račun OH: 134,46 kJ
- na račun M: 130,74 kJ
- skupaj: 320,455 kJ

**Naloge:**

1. V ..... trajajočem poskusu je žival (.....) izdihala ..... litrov CO<sub>2</sub> in porabila ..... litrov O<sub>2</sub>. Izračunajte količino nastale energije in delež maščob in ogljikovih hidratov pri produkciji izmerjene energije!
2. V ..... trajajočem poskusu je žival (.....) izdihala ..... litrov CO<sub>2</sub> in porabila ..... litrov O<sub>2</sub>. V urinu je bilo ugotovljenih ..... gramov dušika. Izračunajte količino nastale energije in delež posameznih hranilnih snovi pri produkciji izmerjene energije!

### 5.2.3 Merjenje bazalnega metabolizma

**Bazalni metabolizem** je najmanjša količina energije, ki je potrebna, da v organizmu potekajo osnovni fiziološki procesi, kot so delo srca, dihanje, sinteza encimov, hormonov in drugih katalitičnih snovi, ekskrecija, prehod skozi membrane itd. V bazalnih razmerah večina energije, sproščene v organizmu, služi za vzdrževanje toplote. Pri normalnem gibanju, opravljanju dela in prehranjevanju v telesu ne poteka bazalni metabolizem. Tega dosežemo, če je organizem v popolnem mirovanju, v postresorptivnem stanju in v termično nevtralnem okolju. V **postresorptivnem stanju** v prebavilih ne potekajo procesi prebave. Zato se poskusna žival ali oseba ne sme hraniti približno 12 ur pred merjenjem. **Termično nevtralnno okolje** predstavlja temperaturo okolice, ki pri poskusnem osebku ne povzroča reakcij termogeneze ali termolize. Temperatura termične nevtralnosti je različna in znaša pri odraslih domačih živalih okoli 20 °C, pri mladičih pa je višja. Predvsem pri prašičih opažamo soodvisnost med temperaturo termične nevtralnosti in telesno maso. Pri mladih pujskih je ta temperatura 30 °C, pri telesni masi od 40 do 80 kg je 20 do 23 °C, pri masi 80 do 110 kg pa 15 do 16 °C.

Bazalno stanje pri živalih le težko dosežemo, saj živalim težko preprečimo vsaj minimalno gibanje. Pri večini živali, razen mesojedov, se hrana dolgo časa zadržuje v prebavilih in zato skoraj ne moremo vzpostaviti postresorptivnega stanja. Zato uporabljamo merjenje **vzdrževalnega metabolizma**. Pri tem živalim omogočimo normalno prehranjevanje in vse gibanje, ki je povezano s hranjenjem. V običajnih razmerah pri sesalcih razlika med bazalnim in vzdrževalnim metabolizmom ni velika.

Vrednosti bazalnega ali vzdrževalnega metabolizma izražamo v kJ na enoto telesne mase ali telesne površine.

### 5.2.4 Kalorimetrija pri prežvekovalcih

Zaradi specifičnosti prebave je kalorimetrija pri prežvekovalcih drugačna oz. mora upoštevati določene posebnosti. Pri procesih fermentacije v vampu nastaja toplota, ki ni dejanski produkt metaboličnih procesov v telesu. Neposredna kalorimetrija je zato zelo otežena in moramo opraviti nekatere popravke.

Kot korekcijski faktor se upošteva količina nastalega metana. Produkcijo toplote v vampu ocenjujemo s približno 9,42 kJ na liter nastalega metana. Tako lahko iz količine nastalega metana izračunamo količino v vampu nastale toplote. Pri kalorimetriji moramo od celotne toplotne produkcije odšteti v vampu nastalo toploto in tako dobimo vrednost telesne metabolične toplote.

Pri indirektni kalorimetriji z merjenjem RQ moramo upoštevati tudi v vampu nastali CO<sub>2</sub>, ki se z izrigavanjem odstranjuje skupaj z izdihanim zrakom. Tudi v tem primeru merimo količino nastalega metana, ki jo upoštevamo kot korekcijski faktor za CO<sub>2</sub>. Po hranjenju je razmerje med CO<sub>2</sub> in metanom 2,6 : 1, po 24 urah se zmanjša na razmerje 1 : 1. Tako izračunani CO<sub>2</sub> odštejemo od celotnega CO<sub>2</sub> in dobimo metabolično vrednost CO<sub>2</sub>. Skupaj s porabo kisika lahko izračunamo RQ.



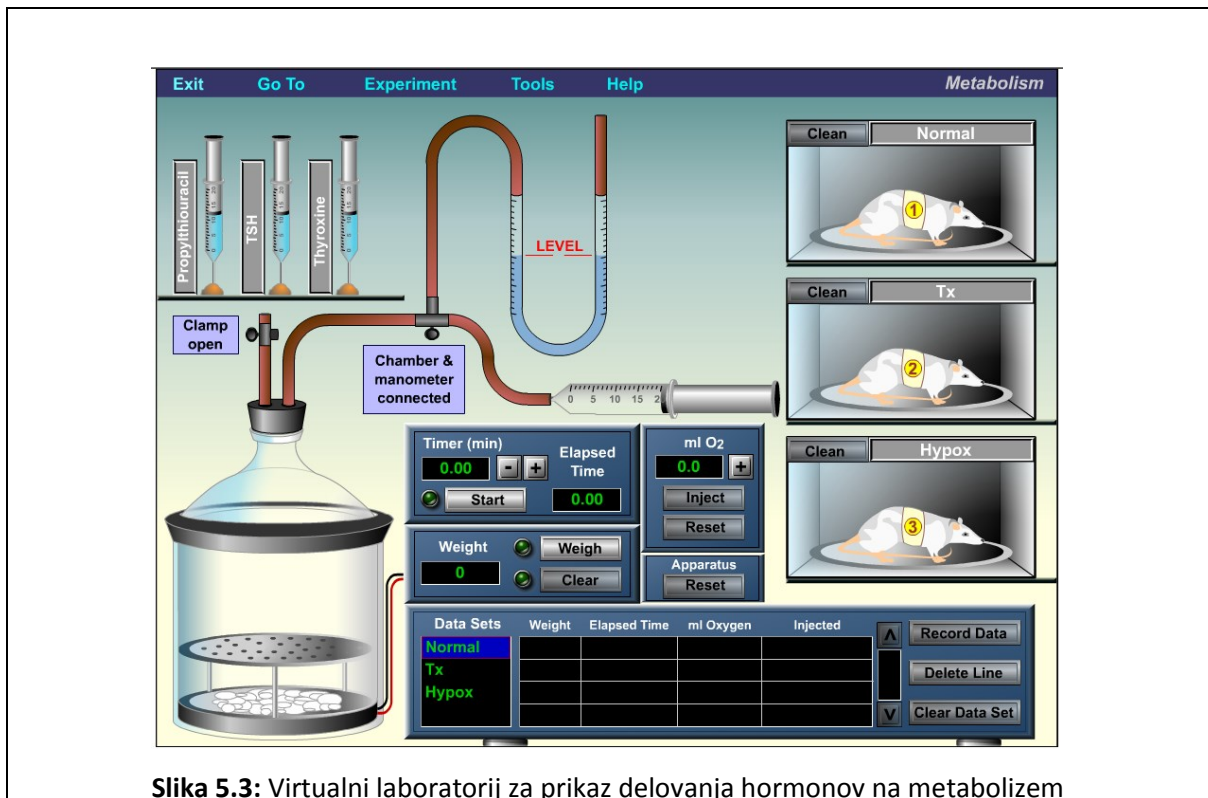
## 5.3 VPLIVI HORMONOV NA METABOLIZEM

### 5.3.1 Učinek ščitničnih hormonov na metabolizem

Najpomembnejši hormon za vzdrževanje metabolizma in telesne temperature je ščitnični hormon tiroksin (T4). Njegovo izločanje uravnava hipofizni hormon TSH (tiroideo stimulirajoči hormon). V prvem poskusu bomo prikazali učinke T4 in TSH na metabolizem živali. Poskus izberemo iz glavnega menija programa (**Fiziologija endokrinega sistema/Metabolizem**). Virtualni laboratorij je prikazan na sliki 5.3.

Na levi strani ekrana je steklena komora za poskusno žival (podgano). V komori je tehtnica, ki je povezana z enoto za prikaz podatkov (na levi). Na tej lahko odčitamo maso živali in uravnavamo trajanje poskusa. Iz zamaška komore izhajata dve cevi. Na levi cevi je prižema, ki jo lahko odpremo (in s tem spustimo atmosferski zrak v komoro) ali zapremo (in s tem komoro zatesnimo). Desna cev je povezana s polkrožnim manometrom, ki je napolnjen s tekočino. Ko žival porablja kisik v zaprtem sistemu, se tekočina v levem kraku manometra dviga, v desnem pa spušča. Drugi krak desne cevi vodi v injekcijsko brizgo, napolnjeno z zrakom, s katero merimo volumen med poskusom porabljenega kisika. Apno na dnu komore absorbira oddani CO<sub>2</sub>. Iz volumna porabljenega kisika in mase živali je mogoče izračunati stopnjo metabolizma živali.

Na desni strani ekrana so tri kletke s podganami, ki jih bomo uporabili v poskusih. Zgornja podgana je netretirana, srednja ima odstranjeno ščitnico (tiroidektomija – **Tx**), spodnja pa hipofizo (hipofizektomija – **Hypox**). V zgornjem levem kotu ekrana so injekcijske brizge s tiroksinom, TSH in propiltiouracilom (snov, ki preprečuje produkcijo tiroksina). Poskuse izvedemo na vseh živalih in jim določimo stopnjo bazalnega metabolizma in stopnjo metabolizma po injekciji tiroksina, TSH ter propiltiouracila. Rezultate meritev zapisujemo (**Record Data**).



Slika 5.3: Virtualni laboratorij za prikaz delovanja hormonov na metabolizem

### **A) Določitev stopnje bazalnega metabolizma**

V prvem poskusu določimo raven bazalnega metabolizma za vsako podgano.

#### **a) Postopek:**

1. Netretirano podgano (**Normal**) premestimo v komoro.
2. S pritiskom na prižemo leve cevke to odpremo. Izpis **Clamp Closed** (prižema zaprta) se spremeni v **Clamp Open** (prižema odprta).
3. S pritiskom na prižemo desne cevke odpremo povezavo z manometrom. Pod njim mora biti izpis **Komora in manometer povezana (Chamber and Manometer Connected)**.
4. Izberemo ukaz **Tehtanje (Weight)** desno od komore. Na izpisu odčitamo maso podgane in jo zapišemo.
5. Z oznakama **(+)** oz. **(-)** ob prikazu časa izberemo 1 min.
6. S pritiskom na prižemo leve cevke to zapremo. Izpis **Prižema odprta (Clamp Open)** se spremeni v **Prižema zaprta (Clamp Closed)**. To onemogoči prehajanje zraka iz zunanosti v komoro.
7. Z ukazom **Start** ob prikazu časa poženemo poskus. Opazujemo, kaj se dogaja z nivojem tekočine v polkrožni cevki. Po eni minuti se poskus prekine. Takrat pritisnemo na gumb konektorja. Zapis pod njim se spremeni v **Manometer in brizga povezana (Manometer and Syringe Connected)**.
8. S pritiskom na prižemo leve cevke to ponovno odpremo, tako da podgana lahko normalno diha.
9. Z oznako **(+)** pod brizgo uravnamo volumen  $O_2$  na 1 ml in izberemo ukaz **Inject**. Nekaj zraka se iztisne v polkrožno cevko. S pritiskanjem na **(+)** in **Inject** nadaljujemo, dokler se raven tekočine v obeh krakih ne izenači. Volumen zraka, ki je potreben za urnavo tekočine v obeh krakih, je enak volumnu  $O_2$ , ki ga je porabila poskusna žival.
10. Izračunajte porabo kisika v eni uri (ml  $O_2$ /h) in stopnjo metabolizma na kilogram telesne mase podgane!
11. Umaknite podgano iz komore v njeno kletko in z ukazom **Reset** pobrišite nastavitve.
12. Ponovite točke 1 do 10 najprej za tiroidektomirano, nato pa še za hipofizektomirano podgano.

#### **b) Naloge:**

1. Rezultate meritev in izračunov vnesite v spodnjo tabelo.
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Kako se je razlikovala stopnja metabolizma pri podganah?
  - Zakaj se je stopnja metabolizma razlikovala?

### **B) Učinek tiroksina na raven metabolizma**

Poskus prikazuje učinek tiroksina na raven metabolizma vseh treh podgan. Pri poskusih na živih živalih moramo injicirati tiroksin (ali katerikoli drug hormon) živali vsakodnevno vsaj 1 do 2 tedna, da je viden kakršenkoli učinek. Pri simulaciji zadostuje eno injiciranje, učinek pa bo enak, kot če bi ga injicirali dalj časa. Z izbiro ukaza **Očisti (Clean)**, ko je podgana še v kletki, lahko v trenutku odstranimo ostanke vseh predhodno injiciranih hormonov in izvedemo na podgani nov poskus. Pri živi živali je potrebnih več tednov, da se hormon odstrani iz telesa.

**a) Postopek:**

1. Eno od podgan prestavimo v komoro. Ker bomo testirali vse tri, vrstni red ni pomemben. Vendar pa moramo v prikazu **Data Set** izbrati tisto podgano, ki jo trenutno uporabljamo (izberemo **Normal, Tx** ali **Hypox**).
2. V prikazu stanja aparature izberemo **Reset**.
3. Brizgo z oznako tiroksin premaknemo v kletko s podgano. Tiroksin se injicira v podgano.
4. Podgano premaknemo v komoro in ponovimo stopnje 1 do 12 prvega poskusa.
5. Po končanem poskusu podgano premaknemo v njeno kletko. Z ukazom **Clear** odstranimo tiroksin iz njenega telesa.
6. Poskus ponovimo še z ostalima dvema podganama.

**b) Naloge:**

1. Rezultate meritev in izračunov vnesite v spodnjo tabelo.
2. Odgovorite na spodnje vprašanje:
  - Kakšen je bil učinek tiroksina na raven metabolizma normalne, tireoidektomirane in hipofizektomirane podgane? Primerjajte ga z nivojem bazalnega metabolizma in razložite vzroke za razlike!

**C) Učinek TSH na raven metabolizma**

V tem poskusu bomo opazovali učinek TSH na raven metabolizma vseh treh podgan.

**a) Postopek:**

1. Eno od podgan prestavimo v komoro. Ker bomo testirali vse tri, vrstni red ni pomemben. V prikazu **Data Set** moramo izbrati tisto podgano, ki jo trenutno uporabljamo (izberemo **Normal, Tx** ali **Hypox**).
2. V prikazu stanja aparature izberemo **Reset**.
3. Brizgo z oznako TSH premaknemo v kletko s podgano. TSH se injicira v podgano.
4. Podgano premaknemo v komoro in ponovimo stopnje 1–12 prvega poskusa.
5. Po končanem poskusu podgano premaknemo v njeno kletko. Z ukazom **Očisti (Clear)** odstranimo tiroksin iz njenega telesa.
6. Poskus ponovimo še z ostalima podganama.

**b) Naloge:**

1. Rezultate meritev in izračunov vnesite v spodnjo tabelo.
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Kakšen je bil učinek TSH na raven metabolizma normalne, tireoidektomirane in hipofizektomirane podgane? Primerjajte ga z nivojem bazalnega metabolizma in razložite vzroke za razlike!

**Č) Učinek propiltiouracila na raven metabolizma**

V tem poskusu bomo opazovali učinek propiltiouracila na raven metabolizma vseh treh podgan. Propiltiouracil zavira produkcijo tiroksina.

**a) Postopek:**

1. Eno od podgan prestavimo v komoro. Ker bomo testirali vse tri, vrstni red ni pomemben. V prikazu **Data Set** izberemo tisto podgano, ki jo trenutno uporabljamo (izberemo **Normal, Tx** ali **Hypox**).

2. V prikazu stanja aparature izberemo **Reset**.
3. Brizgo z oznako propiltiouracila premaknemo v kletko s podgano. Propiltiouracil se injicira v podgano.
4. Podgano premaknemo v komoro in ponovimo stopnje 1–12 prvega poskusa.
5. Po končanem poskusu podgano premaknemo v njeno kletko. Z ukazom **Clear** odstranimo tiroksin iz njenega telesa.

Poskus ponovimo še z ostalima dvema podganama.

**b) Naloge:**

1. Rezultate meritev in izračunov vnesite v zgornjo tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
  - Kakšen je bil učinek propiltiouracila na raven metabolizma normalne, tireoidektomirane in hipofizektomirane podgane? Primerjajte ga z nivojem bazalnega metabolizma in razložite vzroke za razlike!

Parameter		Normal	Tx	Hypox
Bazalni metabolizem	masa (g)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 min (ml)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 uri (ml)			
	raven metabolizma (ml/kg/h)			
Učinek tiroksina	masa (g)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 min (ml)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 uri (ml)			
	raven metabolizma (ml/kg/h)			
Učinek TSH	masa (g)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 min (ml)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 uri (ml)			
	raven metabolizma (ml/kg/h)			
Učinek propiltiouracila	masa (g)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 min (ml)			
	poraba O <sub>2</sub> v 1 uri (ml)			
	raven metabolizma (ml/kg/h)			

(Normal – netretirana, Tx – tiroidektomirana, Hypox – hipofizektomirana podgana)

## LITERATURA

- Cestnik V, Čebulj-Kadunc N: Poskusi in demonstracije v fiziologiji. Del 1. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1993.
- Cestnik V, Čebulj-Kadunc N: Poskusi in demonstracije v fiziologiji. Del 2. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1994.
- Cestnik V: Fiziologija domačih živali: uvod, splošna fiziologija, fiziologija krvi. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1993.
- Cestnik V: Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1996.
- Cestnik V: Fiziologija krvnega obtoka, dihanja, izločanja, urejanja pH in termoregulacije pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1995.
- Cestnik V: Fiziologija prebave pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1994.
- Cestnik V: Metabolizem pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1995.
- Cotter SM: Hematology. 2<sup>nd</sup> ed. Jackson Hole, Wyoming: Teton NewMedia, 2001.
- Cunningham's textbook of veterinary physiology. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis (Missouri): Elsevier Saunders, 2013.
- Dukes' physiology of domestic animals. 12<sup>th</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press, 2004.
- Eades SC, Bounous DI: Laboratory profiles of equine diseases. St. Louis: Mosby, 1997.
- Engelking L, Rebar AH: Metabolic and Endocrine Physiology. Jackson Hole, Wyoming: Teton NewMedia, 2006.
- Farm animal metabolism and nutrition. Wallingford: CABI Publishing, 2000.
- Hlastala MP, Berger AJ: Physiology of respiration. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- Jain NC: Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- McLean JA, Tobin G: Animal and human calorimetry. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- Nemeč Svete A, Frangež R: Klinična biokemija v veterinarski medicini: učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2013.
- Osborne CA, Davis LS, Sanna J, Unger LK, O'Brien TD, Clinton CW, Davenport MP. Identification and interpretation of crystalluria in domestic animals: a light and scanning electron microscopic study. J Vet Med 1990; 85(1):18–37.
- Pivk B: Vaje iz hematologije [Elektronski vir]: delovni zvezek za 3. letnik srednje tehniške šole. Ljubljana: Center RS za poklicno izobraževanje, 2007.
- Sjaastad ØV, Sand O, Hove K: Physiology of Domestic Animals. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 2010.

## LITERATURA

---

- Stabler T, Peterson G: PhysioEx 5.0 laboratory simulations in physiology: with worksheets for human physiology. San Francisco: Benjamin Cummings, 2005.
- Zakon o zaščiti živali. Ur List RS 2013; 38: 1457 (3. 5. 2013)
- Zakon o meroslovju. Ur List RS 2005; 26: 892. (15.3.2005)
- Williams AG, Coleman GS: The rumen protozoa. New York: Springer-Verlag, 1992.