

Laboratorijske simulacije u nastavi fiziologije

doc. dr. sc. Antonela Paladin
Odjel za biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet Split
Ruđera Boškovića 33, Split

Sažetak

Primjenom Zakona o zaštiti životinja RH te načela „3R“ u nastavi predmeta Animalna fiziologija na preddiplomskom studiju Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu više se ne koriste laboratorijske životinje, miševi i štakori. U nastavu je uveden PhysioEx laboratorijski simulacijski software koji omogućava ostvarivanje pojedinih ishoda učenja zadanih za ovaj predmet. PhysioEx se sastoji od dvanaest vježbi te šezdeset i šest laboratorijskih aktivnosti koji se mogu upotrijebiti za nadopunjavanje klasičnih laboratorijskih vježbi u nastavi fiziologije. PhysioEx je jedna od ponuđenih laboratorijskih simulacija te je moguće nastavu osvremenjeniti koristeći i naprednije sustave što ovisi o finansijskim mogućnostima i postavlja se kao cilj u osvremenjivanju nastave.

Uvod

Laboratorijske životinje, miševi i štakori, u nastavne svrhe su se godinama koristile u vježbama iz predmeta Animalna fiziologija koji se izvodi na preddiplomskom studiju Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu s ciljem razumijevanja i usvajanja pojedinih fizioloških procesa u organizmu. Korištenje laboratorijskih životinja u edukaciji podrazumijeva pokuse na životnjama i žrtvovanje životinja. Realizacija vježbi bez laboratorijskih životinja nije dovoljna za ispunjavanje svih ciljeva nastave. Rad sa životnjama mora biti dio edukacije i usavršavanja studenata biologije i veterine jer se osnovna znanja i vještine mogu dobiti samo kroz praktično iskustvo [1]. Zbog zakonskog okvira i načela „3R“ u nastavu iz Animalne fiziologije uvodi se i laboratorijski simulacijski software PhysioEx.

Načelo „3R“

Znanstvenici W. M. S. Russel i R. L. Burch su 1959. g. u knjizi „Principi humane eksperimentalne tehnike“ objavili načelo „3R“ koje se odnosi na načine postupanja, držanja i rada s laboratorijskim životnjama koji uključuju humani pristup i osiguravaju dobrobit laboratorijskih životinja. Načelo je nazvano po eng. riječima replacement, reduction i refinement odnosno zamjena, smanjenje i poboljšanje. Zamjena znači potpunu zamjenu životinja in vitro metodama, računalnim modelima i programima te filmovima kao i zamjena životinja na višem stupnju razvoja onim na nižem stupnju. Smanjenje se odnosi na broj životinja korištenih u istraživanju, a poboljšanje na uvjete držanja životinja te postupanja s njima što doprinosi dobrobiti životinja [2].

Zakonski okvir

Dobrobit životinja je kao vrijednost Europske unije uključena u članak 13. Ugovora o funkciranju Europske unije (UFEU). Direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe razvijena su detaljnija pravila za smanjenje razlika među državama članicama vezano za korištenje životinja. Direktiva 2010/63/EU uključena je u hrvatsko zakonodavstvo Zakonom o zaštiti životinja (NN, 135/06) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN, 55/13) [3].

Zakonom o zaštiti životinja RH propisuje se odgovornost i obveze fizičkih i pravnih osoba radi zaštite životinja tijekom korištenja [4]. Prema članku 30. ovog Zakona u obrazovne svrhe ne smiju se provoditi pokusi na životnjama koji uzrokuju bol, patnju i ozljedu ili smrt životinje. Nadležno tijelo može rješenjem odobriti projekte u obrazovne svrhe ako se provode na sveučilišnim ili znanstvenoistraživačkim ustanovama i ako su nužni za obrazovanje osoba na preddiplomskim ili diplomskim sveučilišnim studijima ili integriranim preddiplomskim ili diplomskim sveučilišnim studijima, ako se zadovoljavajući rezultati ne mogu postići drugim nastavnim pomagalima (kompjutorske simulacije, filmovi, slike, modeli, preparati i sl.) uz uvjet da se za svaku skupinu smije upotrijebiti samo jedna životinja te da projekt provodi osoba sposobljena u skladu s člankom 34. ovoga Zakona [4]. S laboratorijskim životnjama mogu raditi tehničari i znanstvenici sposobljeni kroz odgovarajuće treninge i edukacije koji slijede preporuke i kriterije Europske asocijacije za laboratorijske životinje FELASA-e, što je dokaz osiguranja kvalitete istraživanja i humanog ophođenja sa životnjama [5].

Laboratorijske životinje u edukaciji

Pokusi na laboratorijskim životnjama i dalje će biti glavni dio biomedicinskih istraživanja, ali je bitno je osigurati da se laboratorijske životinje ne koriste kada postoje druge metode koje su humanije, što se posebno odnosi na edukaciju. Postoje dokazi o ispunjavanju nastavnih ciljeva koji uključuju korištenje životinja i životinjskih tkiva na način koji ne štete životnjama i ne uključuju pokuse na životnjama ili ubijanje. Odnose se na neutralne interakcije sa životnjama te uporabu etičkih izvora životinjskih trupla [1].

Napredne metode podučavanja i alternativne pristupe korištenju životinja podržava međunarodna mreža za humanu edukaciju – InterNICHE (International Network for Humane

Education) koja nudi Alternativne baze podataka (Alternatives Database) koje se odnose na zamjene laboratorijskih životinja te definicije i smjernice u vezi s tim pitanjima [6, 7].

Poštujući načelo „3R“ te Zakon o zaštiti životinja (Članak 30.) zamjena laboratorijskih životinja u nastavi iz predmeta Animalna fiziologija postala je cilj te se pristupilo alternativnim metodama iako su uvjeti o sposobljenosti osoblja ostvareni, a životinje su se koristile na sveučilišnoj ustanovi. Analizirajući Alternatives Database, iskustva s drugih fakulteta te poštujući finansijski okvir odabrani su laboratorijski simulacijski softwarei (PhysioEx, Anatomy and Physiology – Revealed) te je u nastavu uveden Koken Rat odnosno model štakora. Laboratorijski simulacijski software PhysioEx uveden je u nastavu iz Animalne fiziologije u akademskoj godini 2016/2017.

PhysioEx - laboratorijski simulacijski software

PhysioEx je laboratorijski simulacijski software s priručnikom koji se sastoji od dvanaest vježbi te šezdeset i šest laboratorijskih aktivnosti koji se koriste za nadopunjavanje ili zamjenu klasičnih laboratorijskih vježbi [8]. PhysioEx sadrži detaljne upute za studente te pregled pojedine teme. Svi prikupljeni podatci, analize rezultata i provjere njihovog razumijevanja i usvojenosti nalaze se na ekranu. Pitanja „Stani i razmisli“ te „Predvidi“ pomažu studentima uspostaviti vezu između aktivnosti i fizioloških koncepata koje pokazuju. Kvizi pitanja na početku te na kraju svake laboratorijske vježbe kao i kratki odgovori koje mogu napisati u izvješću ponuđena su u svakoj aktivnosti. Odgovori na pitanja i rezultati pokusa mogu se spremiti u PDF izvješće. Teme ponuđene u PhysioEx računalnoj simulaciji su: mehanizmi transporta tvari kroz staničnu membranu, fiziologija skeletnog mišića, neurofiziologija živčanog impulsa, fiziologija endokrinog sustava, fiziologija i dinamika krvožilnog sustava, fiziologija dišnog sustava, kemijski i fizički procesi probave, fiziologija bubrega, acido-bazna ravnoteža, analiza krvi, serološko testiranje [8].

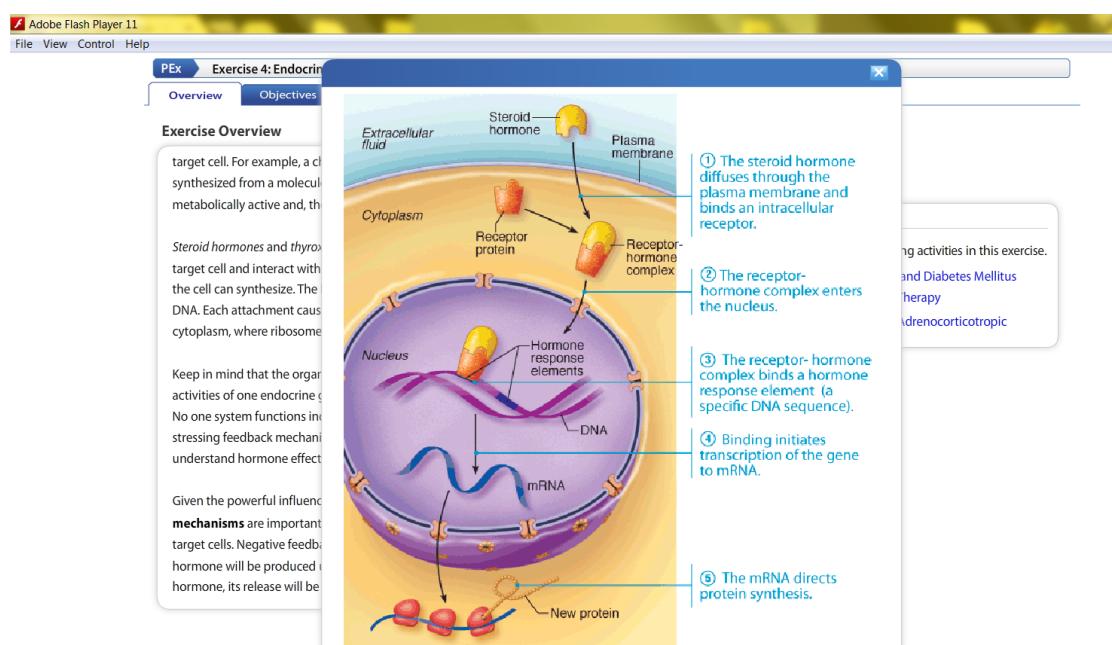
Analiza vježbe Endokrini sustav, aktivnost 1. Metabolizam i tiroksin

1. „Pregled vježbe“ je uvid u osnove endokrinog sustava. Tekst je obogaćen slikama koje se nalaze u pozadini teksta te omogućavaju vizualizaciju pojedinih pojmoveva (Slika 1).

2. „Ciljevi vježbe“ su razumjeti bazalni metabolizam, ulogu tiroksina, gušavost, hipertireozu, hipotireozu, mehanizam povratne sprege, ulogu hipotalamusu u regulaciji sekrecije tiroksina i TSH.

3. „Uvod“ je detaljan pregled o metabolizmu, ulozi i proizvodnji tiroidnog stimulirajućeg hormona (TSH), tireotropina (TRH), ulozi hipotalamusa te mehanizma negativne povratne sprege kao i objašnjenje što će istraživati u odabranoj aktivnosti te video zapis kako se vježba izvodila na štakorima u laboratoriju (Slika 2).

U uvodu je navedena i oprema koja se koristi u provedbi pokusa: injekcije za injektiranje propiltiouracila, tiroidni stimulirajući hormon (TSH) i tiroksin; hermetički zatvorena staklena komora – izolacijski sustav za mjerjenje količine kisika koju je štakor konzumirao u određenom vremenu; manometar – U cijev s tekućinom čija se razina mijenja ovisno o konzumiranom kisiku; injekcija za injektiranje zraka u cijev i mjerjenje količine zraka potrebnog da se razina tekućine u manometru vrati na početnu razinu; vaga za mjerjenje mase životinje; tri štakora – normalni štakor, štakor bez štitne žlijezde i štakor bez hipofize.



Slika 1. Prikaz zaslona s pregledom vježbe „Fiziologija endokrinog sustava, aktivnost 1: Metabolizam i tiroksin“ s osnovnim pojmovima o endokrinom sustavu i uvećanom slikom koja prikazuje način djelovanja hormona u stanici.

4. „Kviz prije vježbe“ su pitanja odnosno tipovi zadataka u kojima student između više ponuđenih rješenja izabire točan odgovor.

5. „Pokus“ se izvodi pomoću uputa u kojima je detaljno opisano što se mora napraviti za pokretanje i završetak pokusa. Za prelazak na sljedeći korak pokusa moraju se provesti određena mjerena i potvrditi ista. Za vrijeme pokusa student mora odgovoriti na pitanja „Stani i razmisli“ te „Predvidi“ koja se oslanjaju na dosadašnje znanje iz fiziologije te sposobnost

povezivanja onoga što se radi u određenoj aktivnosti. Cilj prvog dijela pokusa vježbe „Fiziologija endokrinog sustava, aktivnost 1: Metabolizam i tiroksin“ je odrediti bazalni metabolizam normalnom štakoru, štakoru bez štitne žlijezde i bez hipofize (Slika 3).

In this activity you will investigate the effects of thyroxine and TSH on a rat's metabolic rate. The metabolic rate will be indicated by the amount of oxygen the rat consumes per time per body mass. View the [BMR Measurement wet-lab video](#) to see the measurement of a rat's basal metabolic rate. You will perform four experiments on three rats: **thyroidectomized** rat (a rat whose thyroid gland has been removed), **hypophysectomized** rat (a rat whose pituitary gland has been removed), and **normal** rat. You will determine (1) the rat's basal metabolic rate, (2) its metabolic rate after it has been injected with thyroxine, (3) its metabolic rate after it has been injected with propylthiouracil, a drug that blocks the production of thyroxine by blocking the incorporation of the iodine precursor molecule), thyroid-stimulating hormone (TSH), and (4) its metabolic rate after it has been injected with propylthiouracil.

Equipment Used

- Three refillable syringes—used to inject the rats with thyroxine, TSH, or propylthiouracil to block the production of thyroxine by blocking the incorporation of the iodine precursor molecule), thyroid-stimulating hormone (TSH), and (4) its metabolic rate after it has been injected with propylthiouracil.
- Airtight, glass animal chamber—provides an isolated environment for the rat. A clamp on the left tube allows outside air into the chamber. A clamp on the right tube allows the chamber to be connected to a closed, airtight system. The T-connector on the right tube allows you to connect the chamber to the manometer or to connect the fluid-filled manometer to the syringe filled with air.

3 of 4

Slika 2. Prikaz zaslona „Uvoda“ vježbe „Fiziologija endokrinog sustava, aktivnost 1: Metabolizam i tiroksin“ s kadrom iz video zapisa o mjerenuju bazalnog metabolizma na štakorima u laboratoriju.

Part 1: Determining the Basal Metabolic Rates

In the first part of this activity, you will determine the **basal metabolic rate (BMR)** for each of the three rats.

1a. Drag the **normal** rat into the chamber to find its basal metabolic rate.

Clamp open

Chamber & manometer connected

Normal Clean

Tx Clean

Hypox Clean

Timer (min) 0:00 - + Start ml O₂ 0.0 - + Inject

Weight (g) Weigh Palpate Thyroid Restore

Rat **Weight (g)** **ml O₂/min** **ml O₂/hr** **BMR (ml O₂/kg/hr)** **Palpation** **Injected**

Record Data

Back Next Undo Reset Submit

Slika 3. Prikaz zaslona prvog dijela pokusa vježbe „Fiziologija endokrinog sustava, aktivnost 1: Metabolizam i tiroksin“ s opremom koja se koristi.

6. „Kviz poslije vježbe“ su pitanja odnosno tipovi zadataka u kojima student između više ponuđenih rješenja izabire točan odgovor, ali nakon provedenog pokusa.

7. „Pregledni list“ su pitanja na koje student odgovara opisno i donosi vlastite zaključke o pokusu koristeći rezultate pokusa koji su mu dostupni na zaslonu.

8. „Laboratorijsko izvješće“ sadrži sva pitanja i odgovore koje je student potvrđio prije, tijekom i nakon pokusa te rezultate u obliku tablice i grafa.

Prednosti i nedostatci PhysioEx laboratorijskog simulacijskog softwarea

Iz iskustva nastavnika laboratorijski simulacijski software PhysioEx je koristan alat u modernizaciji nastave iz Animalne fiziologije s nizom pozitivnih karakteristika. Omogućava poštivanje zakonskih okvira te načela „3R“. Korištenje software zahtjeva učionicu opremljenu računalima što studentima omogućava individualan rad uz vođenje i pomoć nastavnika. Računalne učionice na PMF-u u Splitu su standard u održavanju nastave na pojedinim studijima te se koriste i za nastavu iz Animalne fiziologije. Prednosti laboratorijskog simulacijskog softwarea su što studenti mogu ponoviti vježbu, odraditi pokuse bez žrtvovanja životinja i provesti pokuse koje je teško napraviti u laboratoriju zbog nedostatka vremena, sredstava ili sigurnosti.

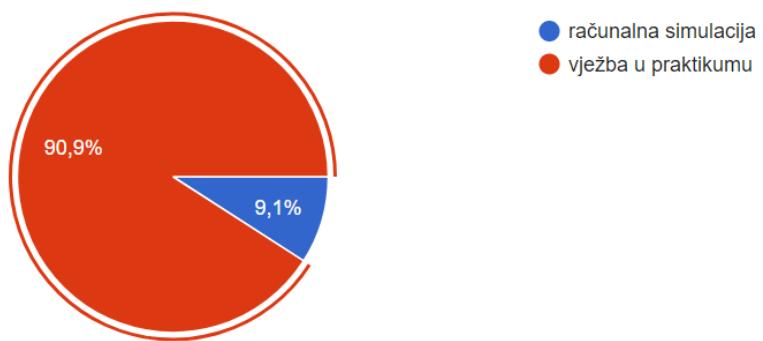
Korisna su i pitanja „Stani i razmisli“ te „Predvidi“ koja omogućavaju studentima provjeru razumijevanja pokusa prije nastavka, zahtijevaju primjenu stečenog znanja na predavanjima te na početku vježbi i potiču međusobnu suradnju studenata ukoliko to nastavnik dozvoli. Dosadašnje iskustvo je pokazalo da studenti uspješno sudjeluju u pokusu te da ih opisi i zadaci koje dobivaju potiču na razmišljanje, povezivanje i postavljanje pitanja o određenoj temi. Iako je za očekivati da nema međusobnih rasprava, nastavnik može zaustaviti rad na računalu i objasniti pojedine pojmove ili raspraviti o pokusu. Mogućnost spremanja rezultata pokusa te odgovora na pitanja u obliku Laboratorijskog izvještaja u PDF formatu omogućava da se isti koristi kao nastavni materijal za ponavljanje i pripremu ispita.

Nedostatci laboratorijskog simulacijskog softwarea PhysioEx iz iskustva nastavnika su ponavljanje sličnih mjerenja, postupaka i grafičkog rješenja u aktivnostima iste vježbe što dovodi do zasićenosti studenata.

Među studentima koji su upisali predmet Animalna fiziologija u akademskoj godini 2017./2018. po završetku vježbi je provedena anketa o laboratorijskom simulacijskom softwareu PhysioEx. Anketa je sadržavala deset pitanja koja se odnose na korištenje softwarea.

Studenti (80%) smatraju da PhysioEx nije doprinio kvalitetnijem usvajanju pojmove iz fiziologije. Kao najkorisniji način usvajanja znanja istakli su usmeno izlaganje nastavnika koje uključuje objašnjenja, pitanja/odgovore i vježbe u laboratoriju. Najbolji dio softwarea prema studentima su: uvodna objašnjenja, kvaliteta vizualnih simulacija odnosno pokusa, kviz pitanja prije i poslije pokusa jer omogućavaju usvajanje i provjeru znanja. Glavni nedostatak za većinu studenata je što software dijelom zamjenjuje samostalan rad u laboratoriju. U manjoj mjeri studenti navode kao nedostatak engleski jezik, često ponavljanje radnji te zvučne efekte za vrijeme pokusa kao i zamjenu rada s laboratorijskim životinjama softwareom. Na pitanje o koristi uvođenja laboratorijskih simulacijskih softwarea u usvajanju pojmove iz Anatomije ili Histologije samo 27% studenata smatra da bi to bilo korisno.

Uspoređujući vježbu „Određivanje hemoglobina“ odraćenu u laboratoriju kolorimetrijskom metodom, a zatim na računalu, 91% studenata smatra da je korisnija i zanimljivija vježba odraćena u laboratoriju (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz odgovora na pitanje o korisnosti vježbe „Određivanje hemohlobina“ odraćenoj na računalu i u laboratoriju.

Zaključak

Laboratorijski simulacijski softwarei u nastavi iz predmeta Animalna fiziologija su zamijenili korištenje laboratorijskih životinja u pojedinim vježbama te omogućili odrađivanje pojedinih vježbi koje je nemoguće izvesti u laboratoriju zbog nedostatka vremena, sredstava i sigurnosti. Na preddiplomskoj razini primjena PhisioEx računalne simulacije omogućava ostvarivanje određenih ishoda učenja zadanih za ovaj predmet. Obzirom da je PhysioEx jedan od ponuđenih laboratorijskih simulacija moguće je nastavu osvremeniti koristeći i naprednije sustave (BIOPAC sustav) što ovisi o financijskim mogućnostima. Kombinacija vježbi u laboratoriju i računalnih simulacija i sustava zasigurno je najbolje rješenje koje će povećati

aktivnost i zadovoljstvo studenata i nastavnika. Pojedina znanstvena istraživanja o podučavanju fiziologije na preddiplomskoj razini pokazuju da studenti preferiraju korištenje različitih načina podučavanja [9]. Neupitna je potreba za primjenom i dalnjim razvojem laboratorijskih simulacija koje će se koristiti u visokom obrazovanju.

Popis literature

1. Jukes, N., Martinsen, S. *Three's a crowd: The IR of replacement for education and training* InterNICHE, Leicester, England, InterNICHE Norway. 2007.
2. *Guide for the Care and Use of Laboratory animals: Eighth Edition*. The National Academies Press, Washington D.C., USA. 2011. <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
3. Buković Šošić, B. *Zakonska regulativa istraživanja na životinjama*. 16. simpozij istraživanja na modelima laboratorijskih životinja: stanje i perspektive u Hrvatskoj i na Sveučilištu u Rijeci, 2016.
4. *Zakon o zaštiti životinja*. Narodne novine d. d. 2017.
https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_10_102_2342.html
5. *Continuing education for persons involved in animal experiments*, FELASA Federation of Laboratory Animal Science Associations: <http://www.felasa.eu/>
6. <http://www.interniche.org/hr/node/3624>
7. Jukes, N., Chiuia, M. *From Guinea Pig to Computer Mouse: Alternative Methods for a Progressive, Humane Education*, 2nd ed. InterNICHE, UK. 2003.
8. Zao, P., Stabler, T. N., Smith, L. A., Lokuta, A., Griff, E. *PhysioEx 9.0: Laboratory Simulations in Physiology*. Pearson. 2014.
9. Dobson, J.L. *Learning style preferences and course performance in an undergraduate physiology class*. Adv Physiol Educ 33: 308–314, 2009.