

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**OCENA DOBROBITI PRAŠIČEV IZ RAZLIČNIH
POGOJEV REJE Z DOLOČANJEM KONCENTRACIJE
KORTIZOLA V DLAKI**

**ASSESSMENT OF THE WELFARE OF PIGS UNDER
DIFFERENT HOUSING CONDITIONS BY
DETERMINING THE CORTISOL CONCENTRATION
IN THE HAIR**

Ana Šket

Ana Žižek

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 591.5:636.083.31:636.4:675.015.26(043.2)

**OCENA DOBROBITI PRAŠIČEV IZ RAZLIČNIH POGOJEV
REJE Z DOLOČANJEM KONCENTRACIJE KORTIZOLA
V DLAKI**

**ASSESSMENT OF THE WELFARE OF PIGS UNDER
DIFFERENT HOUSING CONDITIONS BY DETERMINING
THE CORTISOL CONCENTRATION IN THE HAIR**

Ana Šket

Ana Žižek

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Snoja na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in somentorstvom izr. prof. dr. Marine Štukelj na Kliniki za reprodukcijo in velike živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2024

IZVLEČEK

Ključne besede: dobrobit; ekološka reja; kortizol; prašiči; dlake; način reje

Namen našega dela je bil oceniti dobrobit prašičev iz treh različnih načinov rej; reje na prostem (RP), reje v hlevu z izpustom (HI) in reje v hlevu (RH). V raziskavo smo vključili 51 prašičev krškopoljske pasme, ki smo jih razdelili v tri skupine. Vsaka skupina je izhajala iz enega od navedenih načinov reje. Počutje živali iz vsake skupine smo ob vsakem letnem času ovrednotili z izpolnjevanjem vprašalnika o dobrobiti, ki je obsegal štiri sklope: obnašanje, zdravstveno varstvo, bivalni pogoji in okoljski parametri. Ob vsakem letnem času smo prašičem odvzeli vzorec dlake za določanje koncentracije kortizola. Koncentracijo kortizola v dlaki smo v predhodno pripravljenih ekstraktih dlake določili s komercialnim kompletom, ki temelji na metodi ELISA. Rezultati vprašalnika o dobrobiti živali so pokazali, da je bila v vseh letnih časih najslabše ocenjena reja na prostem, pozimi sta bili najboljše ocenjeni reja v hlevu z izpustom in reja v hlevu, spomladi reja v hlevu z izpustom, poleti reja v hlevu in jeseni reja v hlevu z izpustom. Glede na letni čas so bile najvišje koncentracije kortizola pozimi, nekoliko nižje spomladi, najnižje so bile poleti in jeseni. Glede na reje je bila najvišja koncentracija kortizola pozimi pri prašičih v reji na prostem, spomladi in poleti v reji v hlevu, jeseni pa v reji v hlevu z izpustom. Na podlagi ocen vprašalnika o dobrobiti smo ugotovili, da je najvišja raven dobrobiti v reji v hlevu z izpustom. Na podlagi koncentracije kortizola v dlaki se optimalni način reje razlikuje glede na letni čas, saj je bila pozimi koncentracija kortizola najnižja pri prašičih v reji v hlevu, spomladi pri prašičih v reji v hlevu z izpustom, poleti in jeseni pa v reji na prostem.

ABSTRACT

Key words: welfare; organic farms; cortisol; pigs; hair; housing conditions

The aim of the study was to evaluate the welfare of pigs in three different housing systems: outdoor (RP), mixed (HI) and indoor (RH) housing. Fifty-one pigs of the Krškopolje breed, divided into three groups, were included in the study. Each group came from one of the above-mentioned housing systems. The welfare of the animals in each group was assessed at each season using a welfare questionnaire, consisting of four parts: behavior, health care, housing conditions and environmental parameters. Hair samples were taken from the pigs at each time of year to determine cortisol levels. The cortisol concentration in the hair was determined in pre-prepared hair extracts using a commercial ELISA kit. The results of the animal welfare questionnaire showed that outdoor housing was rated worst in all seasons, while mixed and indoor housing were rated best in winter, mixed housing in spring, indoor housing in summer and mixed housing in autumn. Depending on the season, hair cortisol concentrations in were highest in winter, slightly lower in spring and lowest in summer and autumn. Depending on the housing system, the highest cortisol concentration was found in outdoor housing in winter, in indoor housing in spring and summer, and in mixed housing in autumn. According to the welfare questionnaire, highest level of welfare was found in mixed housing. Cortisol concentration in the hair showed that the optimal housing system depends on the season, as the hair cortisol concentration was lowest in winter in pigs in indoor housing, in spring in pigs in mixed housing, and in summer and autumn in outdoor housing.

KAZALO VSEBINE

1.	UVOD.....	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2	CILJ RAZISKOVANJA.....	3
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	3
2.	PREGLED LITERATURE	4
2.1	STRESORJI IN STRESNI ODZIV	4
2.1.1	Stresni odziv	4
2.1.1.1	Odgovor simpatičnega živčnega sistema.....	4
2.1.1.2	Vloga osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza.....	5
2.1.1.3	Kratkotrajni in dolgotrajni stres.....	7
2.2	PRAŠIČJI STRESNI SINDROM ALI MALIGNA HIPERTERMIJA.....	7
2.2.1	Stresni dejavniki ali stresorji pri prašičih	8
2.3	NALAGANJE KORTIZOLA V DLAKI	9
2.4	METODE UGOTAVLJANJA KONCENTRACIJE KORTIZOLA.....	10
3.	MATERIALI IN METODE DELA.....	11
3.1	PRAŠIČI IN NASTANITEV	11
3.2	POTEK RAZISKAVE.....	13
3.3	VPRAŠALNIK O DOBROBITI	13
3.4	VZORČENJE DLAKE.....	18
3.5	SHRANJEVANJE IN TRANSPORT VZORCEV	18
3.6	POSTOPEK DOLOČANJA KONCENTRACIJE KORTIZOLA	18
3.6.1	Priprava vzorcev dlake	18
3.6.2	Ekstrakcija kortizola iz dlake in določanje koncentracije kortizola v dlaki.....	18
3.7	STATISTIČNA ANALIZA	19
4.	REZULTATI	20

4.1	OCENA DOBROBITI: SKUPNO ŠTEVILO TOČK ZA POSAMEZNE REJE V POSAMEZNIH LETNIH ČASIH	20
4.2	KONCENTRACIJA KORTIZOLA V DLAKI OB RAZLIČNIH LETNIH ČASIH PRI SAMCIH (KASTRATIH) IN SAMICAH	21
4.3	KONCENTRACIJA KORTIZOLA V DLAKI OB POSAMEZNIH LETNIH ČASIH PO POSAMEZNIH REJAH.....	22
4.3.1	Reja na prostem (RP).....	23
4.3.2	Reja v hlevu z izpustom (HI).....	23
4.3.3	Reja v hlevu brez izpusta (RH).....	23
4.4	REJE PO POSAMEZNIH LETNIH ČASIH.....	24
4.4.1	Zima.....	25
4.4.2	Pomlad.....	25
4.4.3	Poletje	25
4.4.4	Jesen	25
5.	RAZPRAVA.....	26
6.	SKLEPI.....	31
7.	POVZETEK	32
8.	ZAHVALE	34
9.	LITERATURA	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: Število kastratov in samic glede na način reje.....	11
Tabela 2: Pogoji bivanja pri posameznih načinih reje prašičev.	12
Tabela 3: Ocena dobrobiti glede na način reje v zimskem, spomladanskem, poletnem in jesenskem času.	20

KAZALO SLIK

Slika 1: Os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza.	6
Slika 2: Mehanizmi nalaganja kortizola v dlaki.	9
Slika 3: Vprašalnik o dobrobiti (Nadlučnik in sod., 2022).....	17
Slika 4: Razlike v koncentraciji kortizola v dlaki med spoloma.	21
Slika 5: Koncentracija kortizola v dlaki ob posameznih letnih časih po posameznih rejah.....	23
Slika 6: Koncentracija kortizola v dlaki v posameznih rejah po posameznih letnih časih.....	24

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ACTH – adenokortikotropni hormon / kortikotropin

CRH – kortikoliberin

CRP– ciljni raziskovalni projekt

ELISA – encimsko imunski test (enzyme-linked immunosorbent assay)

HI – reja v hlevu z izpustom

HPA – hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (hypothalamic-pituitary-adrenal)

PBS – fosfatni pufer z natrijevim kloridom (phosphate-buffered saline)

RH – reja v hlevu

ROAM FREE – robustne živali v trajnostnih mešanih sistemih proste reje (robust animals in sustainable mixed free-range systems)

RP – reja na prostem

1. UVOD

Dobrobit živali predstavlja pojem, za katerega se je skozi čas v različnih strokah oblikovalo več definicij. Vse od njih vključujejo fiziološko stanje živali, počutje in njihovo naravno okolje. Dobrobit je pomemben del reje vseh vrst domačih živali. Začetki zavedanja o pomenu dobrobiti segajo v leto 1965 z oblikovanjem Brambellove komisije, nato pa je leta 1979 Svet za dobro počutje rejnih živali (angl. Farm Animal Welfare Council) napisal pet svoboščin, ki še danes predstavljajo osnovo za vpeljavo dobrobiti živali na različna področja (Johnson in sod., 2019). Pet svoboščin predstavlja odsotnost lakote in žeje, odsotnost fizičnega in klimatskega neugodja, odsotnost bolečine, poškodb in bolezni, možnost izvajanja vedenja, značilnega za živalsko vrsto, ter odsotnost strahu in neugodja (Brambell, 1965). Najbolj splošno znano definicijo dobrobiti je leta 1986 oblikoval Broom, za katerega dobrobit temelji na stanju posamezne živali, ko se poskuša prilagoditi okolju. Podobno definicijo dobrobiti je oblikovala Svetovna organizacija za zdravje živali (World Organisation for Animal Health), ki navaja, da je dobrobit živali fizično in mentalno stanje živali v povezavi s pogoji, v katerih živijo. Dobrobit prašičev je v ozki povezavi s stresom, ki ga prašiči doživljajo v času intenzivne reje (Johnson in sod., 2019).

Stresni odziv je nespecifična reakcija organizma na škodljive dejavnike (Petroff in Greco, 2020). Dobrobit prašičev se spreminja glede na delovanje različnih stresnih dejavnikov. Stresorji so lahko nekateri okoljski dejavniki (neustrezna temperatura, neustrezna vlažnost zraka, hrup, pomanjkanje vode in hrane, močna ali šibka svetloba), psihosocialni dejavniki (boj, podreitev, beg, nova žival v skupini, neznane situacije, stik živali z ljudmi, poškodbe), različni notranji dejavniki (reprodukcijska aktivnost, brejost in laktacija, bolezni in starostne spremembe), med imunološke stresorje uvrščamo patogene mikroorganizme in zajedavce (Martínez-Miró in sod., 2016; Nelson in Kriegsfeld, 2017; Vesel in sod, 2020; Grandin, 2021a). Stresni odziv, ki ga povzročijo omenjeni stresorji, se lahko razdeli na pozitivni stres (eustres) in negativni stres (distres) (Karaer in sod, 2023). Eustres je neškodljiv stresni odgovor, distres pa je stresni odgovor z negativnim vplivom na dobrobit živali (Moberg, 2000).

Ob delovanju stresorja se aktivira simpatični živčni sistem, ki vpliva na delovanje obtočil in dihal, poleg tega preko sredice nadledvične žleze sproži izločanje kateholaminov (adrenalin,

noradrenalin, dopamin) v sistemski krvni obtok. Aktivira se tudi os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (angl. hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis), ki omogoči tvorbo in izločanje glukokortikoidov (Petroff in Greco, 2020). Aktivnost osi HPA lahko ovrednotimo z ugotavljanjem koncentracije kortizola in njegovih presnovkov v telesnih tekočinah, izločkih in tkivih. Ena izmed možnosti je določanje koncentracije kortizola in njegovih presnovkov v dlaki, kar omogoča vpogled v dolgotrajni kortizolski status organizma (Nedić in sod., 2017).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Dobrobit živali je kompleksen pojem z mnogimi vidiki, ki po vsem svetu pridobiva na pomembnosti, hkrati pa je tudi zanimanje družbe zanj vedno večje. Ohranjanje visokih standardov dobrobiti je del socialne odgovornosti koncepta trajnosti (Grandin, 2021b). Raven dobrobiti se razlikuje glede na način reje (Piibor in sod., 2022). Ekološke reje prašičem zagotavljajo možnost vrstno specifičnega obnašanja in posledično višjo raven dobrobiti (Ludwiczak in sod., 2021). Poleg tega so ekstenzivne reje prašičev bolj prijazne do okolja, zaradi dobrega počutja živali so v primerjavi z intenzivnimi prašičerejskimi farmami družbeno bolj sprejemljive. V praksi se izvajajo trije različni načini ekoloških rej, to so reja na prostem, reja v hlevu in kombinacija obeh (Früh, 2011). Vsi trije načini imajo svoje prednosti in pomanjkljivosti. Hlevi so različne kakovosti; lahko so toplotno izolirani, z ogrevanjem in ventilacijo, lahko so brez, lahko so tudi odprti. Prašiči, nastanjeni v hlevih z izpustom, so delno ali popolnoma zaščiteni pred vremenskimi vplivi, takšna nastanitev omogoča rejcu in veterinarju dober nadzor in lažji kontakt (Früh, 2011). Pomanjkljivosti take nastanitve so omejena možnost naravnega obnašanja, kar zaradi neustreznega okolja lahko privede do patološkega in agresivnega vedenja. V primeru neustreznega zračenja in prahu se lahko poveča tudi pojavnost respiratornih obolenj (Ludwiczak in sod., 2021). Na prostem so prašiči skozi vse leto v zunanjem okolju, pri čemer jim je treba omogočiti zavetje. Prednost takšne reje je redkejši pojav stereotipij in agresivnega vedenja, saj prašiči lahko izražajo svoje naravno vedenje, imajo več prostora in obogateno okolje (Früh, 2011; Ludwiczak in sod., 2021). Po drugi strani je v pašnih pogojih vprašljiva biovarnost, pregled nad prašiči je slabši, s tem je oteženo pravočasno odkrivanje in zdravljenje bolezni, potreben je tudi stalen nadzor nad prisotnostjo zajedavcev. Zadnji možni način reje je kombinacija obeh do zdaj opisanih nastanitvev, zato so tudi prednosti in pomanjkljivosti podobne (Früh, 2011). Najbolj optimalen način reje je s tega vidika težko določiti (Ludwiczak in sod., 2021).

V ekoloških rejah vzrejajo tako konvencionalne kot tradicionalne pasme prašičev. Od konvencionalnih pasem se uporabljajo križanci pasem landrace, large white in duroc, vzrejna središča razvijajo nove specializirane genetske linije. Od tradicionalnih pasem so v ekoloških rejah najpogostejše saddleback, mangolica in iberijski prašič, v Sloveniji pa avtohtona pasma krškopoljski prašič (Leenhouwers, 2014; Šalehar, 2015).

Ocenjevanje pogojev reje in s tem dobrobiti je možno z različnimi vprašalniki, ki zajemajo različne aspekte pogojev reje in zdravstvenega stanja živali (Welfare Quality, 2023; Nadlučnik in sod., 2022). Za določanje intenzivnosti odziva nadledvične žleze kot indikatorja stresa pri prašičih je eno izmed razpoložljivih orodij določanje koncentracije kortizola in njegovih presnovkov (Martínez-Miró in sod., 2016), s čimer se ugotavlja aktivnost osi HPA (Palme, 2019).

Za določanje akutnega stresa se koncentracija kortizola lahko meri v krvi, slini, urinu in fecesu. Za ugotavljanje dolgotrajnega stresa je najprimernejši material dlaka. Odvzem naštetih vzorcev z izjemo krvi predstavlja neinvaziven način pridobivanja vzorcev in tako živalim ne povzroča dodatnega nelagodja (Nedić in sod., 2017).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Čeprav ekološka prašičereja predstavlja za živali prijazen način reje, se kakovost nastanitve in s tem dobro počutje živali med posameznimi načini rej razlikujejo. Cilj našega dela je ugotoviti, kateri od načinov reje prašičev, ali reja na prostem, reja v hlevu z izpustom ali reja v hlevu, je s stališča dobrega počutja za prašiče najustreznejši.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednji hipotezi:

1. Predvidevamo, da bo dobrobit prašičev na podlagi rezultatov vprašalnika najvišje ocenjena pri prašičih iz reje na prostem.
2. Predvidevamo, da bo primerjava koncentracij kortizola in njegovih presnovkov v dlaki prašičev najnižja pri prašičih iz reje na prostem.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 STRESORJI IN STRESNI ODZIV

Stresni odziv je nespecifični odgovor organizma na škodljivi dejavnik, ki ga je prvi opisal endokrinolog Hans Selye. Poimenoval ga je splošni adaptacijski sindrom in ga razdelil v tri faze: alarmna, odpora in izčrpanja. Alarmna faza je posledica delovanja stresorja, ki aktivira simpatični živčni sistem in hipofizo. Odpor ali adaptacija se začne z učinki kateholaminov in glukokortikoidov. Če adaptacija ni uspešna in stresor še vedno vztraja, pride do izčrpanja organizma (Petroff in Greco, 2020).

Stres povzročajo zunanji in notranji stresni dejavniki, ki ogrožajo ravnovesje in vplivajo na fizično in psihično zdravstveno stanje organizma (Kovačič in Sketelj, 2021; Karaer in sod., 2023). Z evolucijskega stališča je stresni odziv obrambni mehanizem, ki zagotavlja obstoj posameznika in vrste (Karaer in sod., 2023). Stresni odziv je nespecifičen, kar pomeni, da različni stresorji sprožijo podobno reakcijo organizma. Takoj po delovanju stresorja se aktivira simpatični živčni sistem. Po nekaj minutah se začnejo iz skorje nadledvične žleze izločati glukokortikoidi (Nelson in Kriegsfeld, 2017). Za vrednotenje intenzivnosti stresnega odziva se lahko meri koncentracija glukokortikoidov v telesnih tekočinah, tkivih in izločkih (Karaer in sod., 2023).

Stresor je dejavnik, ki ogroža ravnovesje organizma, obenem sproži procese, ki omogočajo ohranjanje ravnovesja (Karaer in sod., 2023). Neugodni dejavnik postane stresor, ko njegovo delovanje preseže meje normale v smislu intenzivnosti ali časa delovanja (Moss, 1992). Kateri koli dejavnik v okolju, ki ga osebek zazna kot grozečega, je stresni dejavnik. Da je osebek ogrožen, ugotovi z obdelavo senzoričnih informacij v možganski skorji, gre za tako imenovano kortikalno procesiranje (Kovačič in Sketelj, 2021).

2.1.1 Stresni odziv

2.1.1.1 Odgovor simpatičnega živčnega sistema

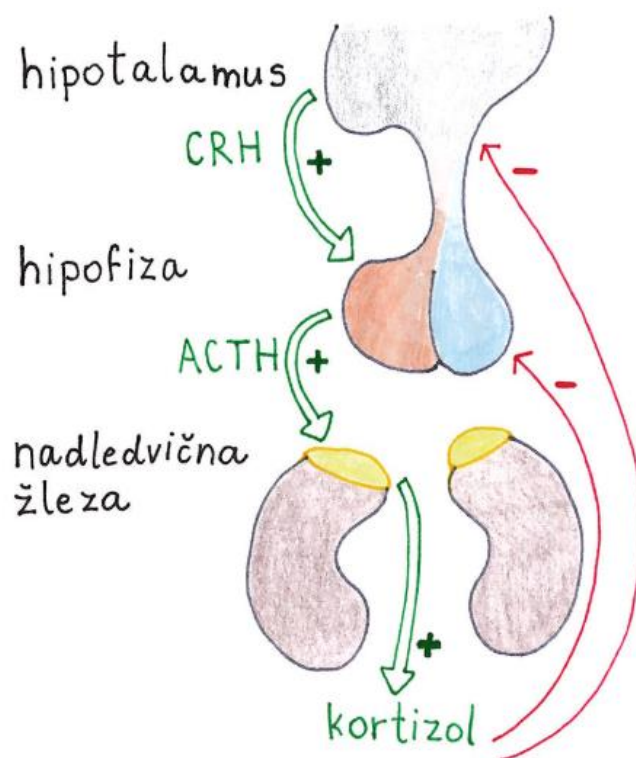
Prvi odgovor organizma na delovanje stresorja je aktivacija simpatičnega živčnega sistema, tako sta v organizmu aktivirani dve različni poti, ki sta med seboj povezani: prenos živčnih signalov po simpatičnem živčnem sistemu in aktivacija simpatiko-adrenomedularne osi. Posledica aktivacije simpatičnega živčnega sistema je pospešeno delovanje srca, povišanje

krvnega tlaka, bronhodilatacija, povečan dotok krvi do pljuč in skeletnih mišic, glikoliza, glukoneogeneza ter izločanje adrenalina iz sredice nadledvične žleze. Adrenalin se sprosti v sistemski krvni obtok kot hormon in tako preko krvi doseže tarčne celice. Zaradi tega se učinki osi simpatikus-sredica nadledvične žleze pojavijo nekaj trenutkov kasneje kot učinki simpatičnega živčnega sistema (Karaer in sod., 2023). Odziv simpatikusa imenujemo tudi odziv za »boj ali beg«. Ta odziv pripomore, da se osebek spopade ali izogne potencialni nevarnosti (Kovačič in Sketelj, 2021).

2.1.1.2 Vloga osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza

Kortizol, glavni glukokortikoid pri večini sesalcev, nastaja v skorji nadledvične žleze, natančneje v *zoni fasciculati* in *zoni reticularis*, pri čemer *zona fasciculata* prevzema večji del produkcije. Izločanje kortizola je posledica aktivacije osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (HPA). Aktivacijo osi sprožijo zunanji in notranji stresorji (Petroff in Greco, 2020). Po biokemijski poti aktivacijo osi HPA sprožijo adrenalin, citokini ali pa se sproži po nevrogeni poti. Adrenalin, sproščen iz sredice nadledvične žleze, spodbuja izločanje kortikotropina (ACTH) iz hipofize, citokini pa spodbudijo izločanje neuropeptida kortikoliberina (CRH) iz paraventricularnega jedra (Bresjanac in sod., 2001; Kovačič in Sketelj, 2021). Aktivacijo po nevrogeni poti sprožijo zunanji in notranji stresni dejavniki. Stresni dejavniki, ki jih zaznajo čutila, po daljši posredni poti aktivirajo paraventricularno jedro v hipotalamusu, čemur sledi senzorična obdelava informacije v možganski skorji. Lahko tudi neposredno aktivirajo hipotalamus in tako informacija potuje po živčnih poteh do hipotalamusa preko samo enega preklopa v možganskem deblu (Kovačič in Sketelj, 2021).

Ob delovanju sprožitvenega dejavnika se iz hipotalamusa začne izločati CRH. Povečanje njegove koncentracije deluje na adenohipofizo, ki začne izločati ACTH v kri (slika 1). ACTH preko aktivacije adenil ciklaze deluje na celice skorje nadledvične žleze, ki začne v krvni obtok izločati kortizol (Kovačič in Sketelj, 2021). V nekaj minutah se tako koncentracija kortizola v krvi močno poviša. Od intenzivnosti stresorja je odvisno, koliko se bo povišala koncentracija kortizola (Petroff in Greco, 2020). Povišana koncentracija kortizola v krvi sproži negativni povratni učinek na izločanje CRH iz hipotalamusa in tudi ACTH iz hipofize. S tem se produkcija kortizola oziroma glukokortikoidov zmanjša. Tako lahko dolgo časa prisotni stresni dejavniki s stalno aktivacijo osi HPA povzročijo negativni povratni učinek, zaradi česar se zmanjša izločanje kortizola.



Slika 1: Os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza.

Figure 1: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Glukokortikoidi uravnavajo presnovne procese, delujejo katabolno in v primeru stresnega odziva omogočajo prilagoditev organskih sistemov (Cestnik, 1996; Petroff in Greco, 2020; Karaer in sod., 2023). Kortizol in drugi glukokortikoidi stimulirajo glukoneogenezo v jetrih in s tem zagotavljajo glukozo kot vir energije, obenem zavirajo privzem glukoze v perifernih celicah. Pospešujejo tudi razgradnjo proteinov v perifernih tkivih in sintezo plazemskih proteinov, na primer angiotenzinogena v jetrih. Sodelujejo pri sintezi eritrocitov, trombocitov in nevtrofilnih granulocitov, hkrati zmanjšujejo število eozinofilnih in bazofilnih granulocitov, limfocitov in monocitov. Zavirajo sproščanje histamina in pro-vnetnih citokinov ter s tem znižujejo intenzivnost vnetnega odgovora. Pospešujejo izločanje solne kisline in pepsina v želodcu in znižujejo produkcijo mukozne zaščite želodčne stene. Stimulirajo izločanje noradrenalina in delujejo imunosupresivno, saj znižujejo stopnjo sinteze protiteles (Cestnik, 1996; Silbernagl in Lang, 2000; Petroff in Greco, 2020). Kratkotrajno povečano izločanje kortizola z znižanjem celične imunosti prepreči poškodbo tkiv zaradi izpostavljenosti citokinom (Petroff in Greco, 2020).

2.1.1.3 Kratkotrajni in dolgotrajni stres

Kratkotrajni ali akutni stres sprožijo stresorji, ki na organizem delujejo od nekaj minut do nekaj ur, kronični stres pa je posledica več dni ali celo mesecev trajajočega delovanja stresorjev (Nelson in Kriegsfeld, 2017). Transport, izolacija, omejeno gibanje ali nova situacija lahko za živali predstavlja akutni stres (Moberg, 2000). V primeru, da akutni stres preide v dolgotrajni oziroma kronični stres, se v organizmu poruši ravnovesje (Nelson in Kriegsfeld, 2017).

Intenzivnost, tip in trajanje delovanja stresorja ter koncentracija in dolžina izločanja kortizola vpliva na to, ali bodo učinki kortizola na organizem adaptivni ali destruktivni (Petroff in Greco, 2020). Kadar je organizem dlje izpostavljen stresnim dejavnikom, ostane os HPA aktivna. V tem primeru učinki kortizola niso več adaptivni, ampak postanejo destruktivni in ogrožajo zdravje organizma. Odgovor na morebiten akutni stresor je lahko slabši, saj kortizol preko negativne povratne zanke deluje na os HPA in s tem zavre izločanje ACTH in kortizola, kar zmanjša sposobnost prilagoditve organizma na stres (Karaer in sod., 2023). Zaradi prehoda koristnega adaptivnega kratkotrajnega stresa v dolgotrajni patološki stres je ogroženo zdravje in preživetje organizma. Učinki kroničnega stresa se kažejo v motnjah delovanja obtočil, presnove, kjer se pojavi anabolni učinek, reprodukcijskih funkcij, prebave, imunskega sistema, pojavi se tudi vpliv na vedenjske in psihološke procese (Nelson in Kriegsfeld, 2017).

2.2 PRAŠIČJI STRESNI SINDROM ALI MALIGNA HIPERtermIJA

Maligna hipertermija je dedno predisponirana bolezen, ki jo pri dovzetnih prašičih sproži kakršen koli stres ter injekcijski in inhalacijski anestetiki. Vzrok je avtosomalna recesivna mutacija gena RYR1, ki predstavlja genski zapis za rianodinski receptor. Rianodinski receptor ima vlogo znotrajceličnega kalcijevega kanala v skeletnomišičnih celicah. Ob stimulusu se kalcijevi kanalčki odprejo, kar povzroči nagel dvig intracelularnega kalcija in posledično močno kontrakcijo mišic in sprostitvev toplote. Klinični znaki so nenadno močno povišana telesna temperatura, rigidnost mišic, tahipneja, tahikardija, hipoksemija, aritmije, nestabilni krvni tlak in mioglobinurija (Anderson in Yves Mulon, 2019). Stanje v večini primerov privede do pogina prašiča, saj pride do močne periferne vazokonstrikcije, povišanja krvnega tlaka čez 400 mm Hg, hitrega dviga telesne temperature do 47 °C in desetkratnega povečanja hitrosti metabolizma (Williams, 2020). V začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so bili

opravljeni prvi genski testi na sindrom maligne hipertermije pri krškopoljskih prašičih. Rezultati so pokazali zelo visoko frekvenco mutiranega gena RYR1. Višjo frekvenco ima samo pasma *pietrain* (Šalehar, 2015).

2.2.1 Stresni dejavniki ali stresorji pri prašičih

Različni stresni dejavniki vplivajo na dobrobit prašičev. Stresni odziv se pri prašičih najpogosteje pojavi zaradi neugodnih okoljskih (eksogenih), notranjih (endogenih) in imunoloških dejavnikov. Enaki stresorji lahko pri živalih povzročijo različen odziv, saj je ta odvisen od starosti, dedne predispozicije, načina reje in individualnih predhodnih izkušenj s stresnim dejavnikom (Martínez-Miró in sod., 2016).

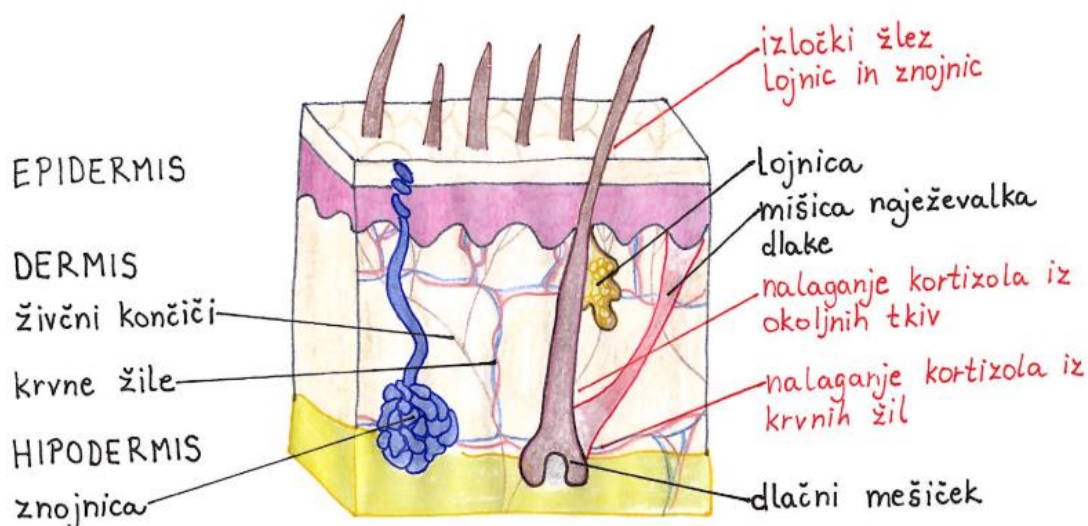
Okoljske stresorje za prašiče predstavljajo neustrezna temperatura, vlažnost, svetloba, hrup, visoka koncentracija dražečih plinov v hlevu, prisotnost prahu ipd. Okoljska temperatura naj bi bila čim bližje termonevtralni temperaturi za določeno kategorijo prašičev (Martínez-Miró in sod., 2016), kar pa je v ekoloških rejah težko zagotoviti (Ludwiczak in sod., 2021). Negativno lahko na dobrobit prašičev vpliva tudi pomanjkanje nastilja (Martínez-Miró in sod., 2016). Stresni dejavniki lahko predstavljajo tudi poškodbe, rane, opekline, vnetni ali degenerativni procesi, ki vplivajo na ravnovesje organizma (Kovačič in Sketelj, 2021). Stresni odziv se pojavi tudi zaradi pomanjkanja oziroma zmanjšane vnosa vode in krme. Pogosteje živali z višjega socialnega statusa onemogočijo dostop do krme podrejenim živalim. Tudi bolezni sprožijo stresni odziv, tako stresorji lahko pripomorejo k nastanku bolezni ali pa stresor predstavlja bolezen sama. Za prašiče je lahko akutni stres tudi stik človeka s prašiči zaradi različnih opravil, kot so jemanje krvi, označevanje in kastracija (Martínez-Miró in sod., 2016). Stres lahko poslabša kakovost mesa prašičev ob prisotnosti RYR1 mutiranega gena (Anderson in Yves Mulon, 2019), saj lahko povzroči nastanek bledega mehkega vodenega ali temnega čvrstega suhega mesa (Martínez-Miró in sod., 2016). Do stresnega odziva zaradi socialnih dejavnikov pride pri vzpostavljanju hierarhije v primeru ustvarjanja novih skupin, v katerih se prašiči med seboj ne poznajo. Primeri takih situacij so združitev svinj v času brejosti in po praritvi ter združitev prašičev med pitanjem in pred transportom v klavnico. Intenzivnost stresnega odziva je odvisna od števila prašičev v skupini in prostora, v katerem so nastanjeni, vpliv imata tudi dedna predispozicija in spol. Stresni odziv na socialne dejavnike je pri samcih bolj intenziven kot pri samicah (Martínez-Miró in sod., 2016). Za prašiče, ki niso vajeni prisotnosti ljudi, predstavlja stresni dejavnik tudi stik z ljudmi. Kot je

bilo že navedeno, stres zaradi endogenih dejavnikov predstavljajo reprodukcijska stanja, kot so estrus, brejost in porod, bolezni in starostne spremembe. Imunološki stres se pojavi zaradi infekcije s patogenimi mikroorganizmi ali invazije zajedavcev.

2.3 NALAGANJE KORTIZOLA V DLAKI

Kortizol se v dlako nalaga v času njene rasti, torej med anageno fazo (Sergiel in sod., 2020). Kot je prikazano na sliki 2, v rastočo dlako prehaja iz krvi, ki oskrbuje dlačni mešiček, natančneje iz cirkulacije medularne regije v sredici dlačnega mešička (Wright in sod., 2015), pa tudi z difuzijo iz tkiv, ki obdajajo rastočo dlako (Sergiel in sod., 2020). Nahaja se lahko tudi na površini dlake, saj tja pride s potom in izločkom žlez lojnic (Wright in sod., 2015) ter s slino. Ugotovljeno je bilo, da kortizol lahko nastaja tudi v koži, natančneje v dlačnih mešičkih, melanocitih, epidermalnih melanocitih in dermalnih fibroblastih, saj se v njih odvijajo funkcionalno podobni procesi, kot v osi HPA (Sharpley in sod., 2013).

Koncentracija kortizola je večja v dlaki, ki raste na bazi repa, ker verjetno te dlake potrebujejo večjo oskrbo s krvjo za svojo rast in so zato bolj izpostavljene kortizolu v krvi (Vesel in sod., 2020). Še vedno pa ni popolnoma raziskano, če tudi barva dlake vpliva na koncentracijo kortizola. Na podlagi študij, ki so jih na prašičih opravili Heimburge in sod., 2020, naj bi bile koncentracije kortizola višje v črni kot v beli dlaki prašičev.



Slika 2: Mehanizmi nalaganja kortizola v dlaki.

Figure 2: Mechanisms of cortisol deposition in hair.

2.4 METODE UGOTAVLJANJA KONCENTRACIJE KORTIZOLA

Kmalu po aktivaciji osi HPA se poviša koncentracija kortizola v krvi, slini in urinu. Ti parametri odražajo stanje kortizola za nekaj minut nazaj. Ugotavljanje koncentracije glukokortikoidov v krvi kot biomarkerja stresnega odziva ni priporočljiva, saj lahko odvzem krvi in manipulacija s prašičem povzroči stresni odziv in tako zabiše vpogled v realno stanje organizma. Vzorčenje sline, urina, fecesa in dlake je bolj primerno, saj je neinvazivno, enostavno ter neboleče, prašičem pa ne povzroča dodatnega stresa (Nedić in sod., 2017).

Koncentracijo kortizola in njegovih presnovkov lahko merimo v fecesu, zaradi časa pasaže črevesne vsebine skozi prebavila na ta način dobimo podatek o aktivnosti nadledvične žleze v zadnjih 24 urah (Palme, 2019). Za vrednotenje daljšega obdobja aktivnosti nadledvične žleze je najprimerneje določati koncentracijo kortizola in njegovih presnovkov v dlaki. V tem primeru dobimo vpogled v kumulativno aktivnost nadledvične žleze zadnjih tednov ali mesecev. Za analizo vsebnosti kortizola v dlaki je potrebna zelo majhna količina dlake, samo jemanje vzorcev pa ne vpliva na koncentracijo kortizola v dlaki (Vesel in sod., 2020).

3. MATERIALI IN METODE DELA

3.1 PRAŠIČI IN NASTANITEV

Študijo smo izvedli v dveh rejah prašičev, v treh različnih skupinah. Študija je bila del projekta ROAM-FREE (ERA-Net CORE Organic Cofound), postopki na živalih so bili odobreni s strani Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (št. odločbe U34401-6/2022/11). V raziskavo je bilo vključenih 51 tekačev krškopoljske pasme, ki so bili razdeljeni v tri skupine, ki so se razlikovale glede na način reje. V prvi skupini so bili prašiči, ki so bili nastanjeni na ograjenem pašniku skupaj z ovcami (RP). Prašiči so imeli možnost umika v senco pod drevesa ali v zatočišče, ki je bilo nastlano s slamo. V zatočišče so se lahko zatekli tudi pozimi. Druga skupina prašičev je bila nastanjena v hlevu z izpustom na pašnik (HI), tretja skupina je bila celotno trajanje poskusa v hlevu (RH). Vsi prašiči so izvirali iz iste slovenske ekološke reje. Ob začetku raziskave so bili prašiči stari 11 tednov. Skupina RP se je nahajala na Vremščici, skupini HI in RH pa na Studencu. Število prašičev v posameznih skupinah prikazuje tabela 1.

Tabela 1: Število kastratov in samic glede na način reje.

Table 1: Number of castrates and females, depending on housing.

način reje	skupno število prašičev	samci-kastrati	samice
RP	17	7	10
HI	20	8	12
RH	14	7	7
SKUPAJ	51	22	29

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu

Legend

RP - outdoor, HI - mixed, RH - indoor

Pogoji posameznih načinov reje so prikazani v tabeli 2.

Tabela 2: Pogoji bivanja pri posameznih načinih reje prašičev.

Table 2: Housing conditions for each pig farming methods.

	RP	HI	RH
dostop do vode	stalno	stalno	stalno
krmljenje	dvakrat dnevno	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>
krma	ekološka	ekološka	ekološka
stik z ljudmi	da	da	da
zavetje pred vremenskimi dejavniki	da	da	da
prisotnost drugih živalskih vrst	da (ovce)	ne	ne
gibanje	prosto gibanje	prosto gibanje	prosto gibanje, (2,5 m ² na prašiča)
tip tal	zemlja, trava, naravna tla	beton, naravna tla	beton
obogatitev okolja	slama, gume	slama	slama, plastične žoge
nastilj	slama	slama	slama, globok nastilj
ventilacija	naravna	naravna	naravna
ogrevanje	ne	ne	ne
osvetlitev	naravna	naravna	naravna

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu

Legend

RP - outdoor, HI - mixed, RH - indoor

3.2 POTEK RAZISKAVE

V vsakem letnem času smo ob prihodu v vsako skupino prašičev najprej z vprašalnikom ocenili dobrobit, nato smo vsakemu prašiču v raziskavi enkrat odvzeli vzorec dlak na hrbtu za določanje koncentracije kortizola. Zimsko vzorčenje je potekalo februarja, spomladansko maja, poletno julija in jesensko oktobra 2023. Vsa vzorčenja so potekala v dopoldanskih urah.

3.3 VPRAŠALNIK O DOBROBITI

Vprašalnik o dobrobiti je vključeval ocenjevanje obnašanja, zdravstvenega varstva, bivalnih pogojev in okoljskih razmer. Izpolnili smo ga za vsako rejo posebej ob vzorčenju v vsakem letnem času. Vprašalnik je bil pripravljen v okviru projekta CRP – V4-2024: Reja domačih živali z nadgradnjo dobrobiti živali v skladu z družbenimi zahtevami (Dovč, 2023), objavljen je bil v znanstveni reviji (Nadlučnik in sod., 2022,). Vprašalnik je prikazan na sliki 3.

V sklopu »obnašanje« smo ocenjevali odziv prašiča ob pristopu rejca, oskrbovalca ali tujca; radovednost in raziskovalno obnašanje ter opazovali agresivnost med prašiči; čistočo, vidne posledice agresije (pogrizene repe in ušesa). Pod temo »zdravstveno varstvo« smo opazovali in ocenjevali izenačenost prašičev, pregledali smo parklje in stoje, bili pozorni na kašljanje in kihanje, prisotnost konjunktivitisa in/ali izcedka iz nosnic, driske, umbilikalne ali ingvinalne hernije, ocenjevali hojo ter morebitno šepanje prašičev. »Bivalni pogoji« so obsegali trditve v zvezi z gostoto naselitve prašičev, krmilnim prostorom in napajalniki, stanjem napajalnikov, čistostjo tal in nastilja, zdravstveno ustreznostjo krme, kakovostjo vode, zavetjem in materialom za zaposlitev. V sklopu »okoljske razmere« smo kontrolirali prisotnost prahu in vonja po amonijaku v hlevu.

OPIS		OCENA				
OBNAŠANJE						
1	<p>Živali so radovedne, kažejo raziskovalno obnašanje, ni opaziti agresivnosti med živalmi. Obkrožite ustrezen odgovor</p> <p>1 – Več kot 30 % živali ima vidne nepravilnosti (apatične/kažejo znake agresije), 2 – 25 % živali ima vidne nepravilnosti, 3 – 10 % živali ima vidne nepravilnosti, 4 – Posamezne živali imajo vidne nepravilnosti, 5 – Vse živali so radovedne, kažejo raziskovalno obnašanje, ni vidne agresije</p>	1	2	3	4	5
2	<p>Živali so videti prestrašene zaradi rejca, oskrbovalca, tujcev. Obkrožite ustrezen odgovor</p> <p>1 – Vse živali se ob prisotnosti človeka močno vznemirijo in ostanejo vznemirjene dlje časa, 2 – Vse živali se ob prisotnosti človeka vidno vznemirijo in sčasoma pomirijo, 3 – V posameznih boksih se prašiči vidno vznemirijo in sčasoma pomirijo, 4 – Živali se ob prisotnosti človeka blago vznemirijo in nato hitro pomirijo, 5 – Živali se ob prisotnosti človeka/rejca ne vznemirijo</p>	1	2	3	4	5
3	<p>Pitanci/tekači so umazani, vidne so posledice agresije (rane, opraskanine), pogrizeni repi in ušesa. Obkrožite ustrezen odgovor</p> <p>1 – Več kot 30 % živali ima vidne nepravilnosti, 2 – 25 % živali ima vidne nepravilnosti, 3 – 10 % živali ima vidne nepravilnosti, 4 – Posamezne živali imajo vidne nepravilnosti, 5 – Živali nimajo nobenih vidnih sprememb</p>	1	2	3	4	5
ZDRAVSTVENO VARSTVO (pregledamo živali ob obhodu po hlevu)						
1	<p>Živali niso izenačene po velikosti in/ali prisotni so zahiranci. Obkrožite ustrezen odgovor</p> <p>1 – Več kot 30 % boksov ima neizenačene živali/prisotne zahirance, 2 – 25 % boksov ima neizenačene živali/prisotne zahirance, 3 – 10 % boksov ima neizenačene živali/prisotne zahirance, 4 – Posamezne neizenačene živali/posamezni zahiranci v reji, 5 – Vsi boksi so izenačeni, ni zahirancev</p>	1	2	3	4	5
2	<p>Pregled parkljev in stoje. Obkrožite ustrezen odgovor</p> <p>1 – Več kot 30 % živali ima težave s parklji, 2 – 25 % živali ima težave s parklji, 3 – 10 % živali ima težave s parklji, 4 – Posamezne živali imajo težave s parklji, 5 – Noben prašič nima težav s parklji</p>	1	2	3	4	5
3	<p>Prisotno je kašljanje in/ali kihanje. Obkrožite ustrezen odgovor</p>	1	2	3	4	5

	1 – Več 30 % prašičev kašlja/kiha, 2 – 25 % prašičev kašlja/kiha, 3 – 10 % prašičev kašlja/kiha, 4 – Posamezni prašiči kašljajo/kihajo, 5 – Ni kašljanja ali kihanja					
4	Prisoten je konjunktivitis in/ali izcedek iz nosnic. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % prašičev ima konjunktivitis/izcedek iz nosu, 2 – 25 % prašičev ima konjunktivitis/izcedek iz nosu, 3 – 10 % prašičev ima konjunktivitis/izcedek iz nosu, 4 – Posamezni prašiči imajo konjunktivitis/izcedek iz nosu, 5 – Noben prašič nima konjunktivitisa/izcedka iz nosu	1	2	3	4	5
5	Prisotne so poškodbe kože in/ali abscesi. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % prašičev ima poškodbe kože in/ali abscese, 2 – 25 % prašičev ima poškodbe kože in/ali abscese, 3 – 10 % prašičev ima poškodbe kože in/ali abscese, 4 – Posamezni prašiči imajo poškodbe kože in/ali abscese, 5 – Ni vidnih poškodb ali abscesov	1	2	3	4	5
6	Prisotna je driska. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % živali ima drisko, 2 – 25 % živali ima drisko, 3 – 10 % živali ima drisko, 4 – Posamezni prašiči imajo drisko, 5 – Ni vidnih težav z drisko	1	2	3	4	5
7	Prisotne so umbilikalne in ingvinalne hernije. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % prašičev ima umbilikalne/ingvinalne hernije, 2 – 25 % prašičev ima umbilikalne/ingvinalne hernije, 3 – 10 % prašičev ima umbilikalne/ingvinalne hernije, 4 – Posamezni prašiči imajo umbilikalne/ingvinalne hernije, 5 – Noben prašič nima umbilikalne/ingvinalne hernije	1	2	3	4	5
8	Živali šepajo, težko hodijo. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % prašičev šepa, težko hodi, 2 – 25 % prašičev šepa, težko hodi, 3 – 10 % prašičev šepa, težko hodi, 4 – Posamezne živali šepajo, težko hodijo, 5 – Noben prašič ne šepa, težko hodi	1	2	3	4	5
BIVALNI POGOJI (tudi paša in izpusti, obogateno okolje, možnost socialnega kontakta)						
1	Gostota živali je prevelika. Obkrožite ustrezen odgovor 1 – Več kot 30 % boksov ima preveliko gostoto živali, 2 – 25 % boksov ima preveliko gostoto, 3 – 10 % boksov ima preveliko gostoto, 4 – Gostota živali ustreza glede na minimalne standarde, 5 – Prašiči imajo 10 % dodatne površine več, kot je zahtevano	1	2	3	4	5

	Živalim je na voljo dovolj krmilnega prostora in napajalnikov. Obkrožite ustrezen odgovor					
2	1 – Napajalniki in krmilniki niso dostopni večini živali/jih je manj, kot je zakonsko dovoljeno, 2 – Voda je nalita v korita, 3 – Pri restriktivnem krmljenju je premalo krmilnih mest/Zaradi prevelikega števila živali je premalo krmilnikov in napajalnikov/V nekaterih boksih je premalo krmilnikov in napajalnikov, 4 – Po standardih, 5 – V vsakem boksju je več kot minimalno predpisano število krmilnikov in napajalnikov, vse živali imajo dostop do njih	1	2	3	4	5
3	Napajalniki puščajo, celotna tla boksov so umazana, nastilja ni/je izrabljen. Obkrožite ustrezen odgovor	1	2	3	4	5
4	Onesnažena/plesniva krma v koritih, krma, razsuta poleg krmilnikov, vprašljiva kakovost vode. Obkrožite ustrezen odgovor	1	2	3	4	5
5	Živali, ki so rejene zunaj/na prostem, imajo zavetje. 1 - Živali nimajo zavetja, 2 - Živali imajo senco (drevesa) vendar ne zgrajenega zavetja/zavetje je neustrezno, 3 - Živali imajo zavetje, vendar je neurejeno in zamazano, 4 - Živali imajo zavetje, 5 - Živali imajo zavetje s slamo, krmilniki in napajalniki	1	2	3	4	5
6	Prisoten je material za zaposlitev. Opišite vrsto materiala, ki ga vidite	1	2	3	4	5
	OKOLJSKE RAZMERE					
1	V hlevu je veliko prahu. Obkrožite ustrezen odgovor	1	2	3	4	5
2	V hlevu je močno zaznaven vonj po amonijaku. Obkrožite ustrezen odgovor	1	2	3	4	5

	1 – Presega maksimalno dovoljeno mejo (25 ppm), 2 – V več kot 50 % prostorov močno zaznaven vonj po amonijaku (nad 10 ppm), 3 – Ponekod zaznan močnejši vonj po amonijaku (med 5–10 ppm), 4 – Blag vonj po amonijaku (do 5 ppm), 5 – Vonj po amonijaku ni zaznaven v nobenem od prostorov					
--	---	--	--	--	--	--

Slika 3: Vprašalnik o dobrobiti (Nadlučnik in sod., 2022).

Figure 3: Welfare questionnaire (Nadlučnik et al., 2022).

3.4 VZORČENJE DLAKE

Vzorčenje je pri vseh skupinah potekalo štirikrat, enkrat v vsakem letnem času, kot je navedeno v podpoglavju 3.2. Prašiče smo identificirali na podlagi ušesne številke in jim določili spol. Nato smo vsakemu prašiču odvzeli vzorec dlak na področju hrbta. Odvzete dlake smo shranili v plastičnih epruveh, označenih z individualno številko prašiča, ki smo jih zbirali v plastične vrečke. Tako so bili vzorci glede na letni čas spremljani za vsakega individualnega prašiča.

3.5 SHRANJEVANJE IN TRANSPORT VZORCEV

Vse epruvete smo zaprli z zamaškom in jih dali v transportno vrečko. Transport vzorcev je potekal na sobni temperaturi. Vzorce smo do pričetka analize hranili v zmrzovalniku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Inštitutu za predklinične vede, Enota za farmakologijo in toksikologijo, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana.

3.6 POSTOPEK DOLOČANJA KONCENTRACIJE KORTIZOLA

3.6.1 Priprava vzorcev dlake

Posamičen vzorec dlak smo dali v terilnik in ga prelili s tekočim dušikom. Zmrznjene dlake smo za tem strli z ohlajenim pestilom. Zmleti vzorec smo prenesli v stekleno čašo s kapaciteto 10 ml in ga za 30 minut dali v sušilnik, segret na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za tem smo 50 mg posušenega vzorca dali v polipropilensko epruveto s prostornino 4 ml.

3.6.2 Ekstrakcija kortizola iz dlake in določanje koncentracije kortizola v dlaki

K 50 mg zmletih dlak v 4 ml krioviali smo dodali 3 ml 80 % metanola in 5 sekund mešali z vorteksom (Thermo, Tehnica Železniki, Železniki, Slovenija). Nato smo vzorce 18 ur mešali na stresalniku (Vibromix 313 EVT, Tehnica Železniki, Železniki, Slovenija) pri 400 obratov na minuto in temperaturi $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($23\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Centrifugirali smo 15 minut pri $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2500 g. Ekstrakt smo previdno odpipetirali v novo kriovialo in pričeli s sušenjem pod curkom dušika pri temperaturi $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorcem smo dodali še 0,8 ml 80 % metanola in eno minuto mešali z vorteksom. Vzorce smo nato centrifugirali 15 minut pri 2500 g in temperaturi $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrakt smo previdno odpipetirali in ga dodali prvemu ekstraktu, ki se je v tem času sušil pod curkom dušika. Ekstrakte smo posušili do suhega. Do analize smo posušene ekstrakte

hranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred analizo smo vzorce ogreli na sobno temperaturo in jih eno uro rekonstruirali v 500 μl pufra PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA).

Kortizol v dlaki smo določili s komercialnim kompletom Cortisol free in saliva ELISA (Demeditec, Kiel, Nemčija) po navodilih proizvajalca. V postopku določanja koncentracije kortizola smo uporabili še naslednje pripomočke in aparature: multipipeta multipipette plus (Eppendorf, Hamburg, Nemčija), aparaturna za spiranje mikrotitrskih plošč Wellwash (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finska), čitalec mikrotitrskih plošč Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finska), računalniški program za izpis rezultatov iz čitalca Skanit software 3.1 (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finska).

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Statistična analiza in grafični prikaz podatkov sta bila izvedena s pomočjo programa RStudio (verzija 2023.12.1). V analizo je bilo vključenih 51 prašičev, za katere je bilo mogoče pridobiti vzorce v vseh meritvenih obdobjih. Normalnost porazdelitve podatkov je bila ocenjena z vizualnim pregledom histogramov ter uporabo Shapiro-Wilkovega testa. Obe metodi sta pokazali nenormalno porazdelitev podatkov, zato so bili v statistični analizi uporabljeni neparametrični testi. Primerjava vrednosti kortizola med spoloma je bila izvedena z uporabo U testa po Mannu in Whitneyju za neodvisne vzorce. Ker pri specifični primerjavi spolov znotraj vsake reje pri posameznem letnem času nismo ugotovili značilnih razlik, smo nadaljnjo statistično analizo za posamezno rejo v okviru letnega časa izvajali na združenih rezultatih meritev samcev in samic. Razlike v vrednostih kortizola v dlaki prašičev tekom letnih časov so bile ocenjene z uporabo Friedmanovega testa za odvisne vzorce, kot *post hoc* test parnih primerjav pa je bil uporabljen Willcoxonov test z Bonferronijevo korekcijo. Razlike v vrednostih kortizola v dlaki prašičev med posameznimi rejami smo analizirali za vsak letni čas posebej z uporabo Kruskal-Wallisovega testa vsote rangov, kot *post hoc* test parnih primerjav je bil uporabljen Dunnov test, s korekcijo po Bonferroniju. Meja stopnje značilnosti je bila uporabljena kot $p < 0,05$. Za osnovni statistični opis podatkov smo uporabili pet povzetrov – mediana, meje prvega in tretjega kvartila ter minimalno in maksimalno vrednost. Grafični podatki so predstavljeni v obliki kvantilnih grafikonov.

4. REZULTATI

Rezultati so prikazani ločeno za rezultate, pridobljene z izpolnjevanjem vprašalnika o dobrobiti, in rezultate meritev koncentracije kortizola v dlaki.

4.1 OCENA DOBROBITI: SKUPNO ŠTEVILO TOČK ZA POSAMEZNE REJE V POSAMEZNIH LETNIH ČASIH

V tabeli 3 je ocena podana s številom točk. Maksimalno skupno število točk je 95.

Tabela 3: Ocena dobrobiti glede na način reje v zimskem, spomladanskem, poletnem in jesenskem času.

Table 3: Welfare assessment in winter, spring, summer and autumn according to the housing system.

	obnašanje	zdravstveno varstvo	bivalni pogoji	okoljske razmere	skupaj
zima					
RP	8	35	26	10	79
HI	12	36	27	9	84
RH	12	36	27	9	84
SKUPAJ	32	107	80	28	247
pomlad					
RP	14	34	23	10	81
HI	14	39	24	10	87
RH	13	37	27	8	85
SKUPAJ	41	110	74	28	253
poletje					
RP	15	36	19	10	80
HI	14	35	27	10	86
RH	14	38	27	9	88
SKUPAJ	43	109	73	29	254
jesen					
RP	13	33	19	10	75
HI	14	32	27	10	83
RH	12	35	27	8	82
SKUPAJ	39	100	73	28	240

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu

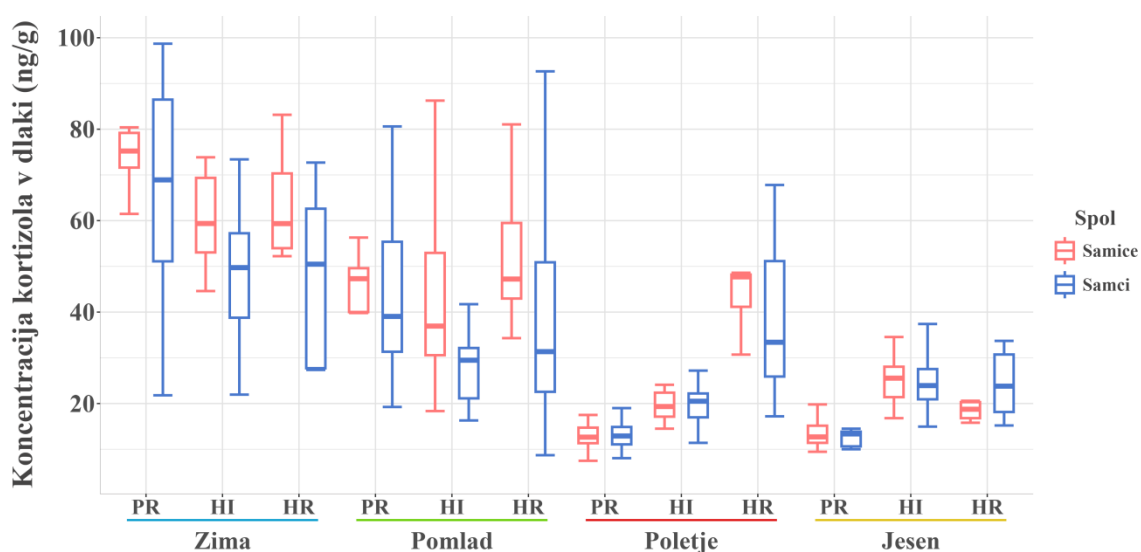
Legend

RP - outdoor, HI - mixed, RH - indoor

V zimskem času imata HI in RH enako in s tem najvišje število točk, najnižje število točk pozimi ima RP. Spomladi ima najvišje število točk HI, najnižje RP. Poleti ima največ točk RH, najmanj pa RP. Jeseni je najvišje število točk pri HI, najnižje je pri RP.

RH ima najvišje število točk poleti, najnižje je jeseni. HI ima najvišje število točk spomladi, najnižje pa jeseni. RP ima najvišje število točk spomladi, najnižje je jeseni.

4.2 KONCENTRACIJA KORTIZOLA V DLAKI OB RAZLIČNIH LETNIH ČASIH PRI SAMCIH (KASTRATIH) IN SAMICAH



Slika 4: Razlike v koncentraciji kortizola v dlaki med spoloma.

Figure 4: Differences in cortisol levels in hair between the sexes.

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu

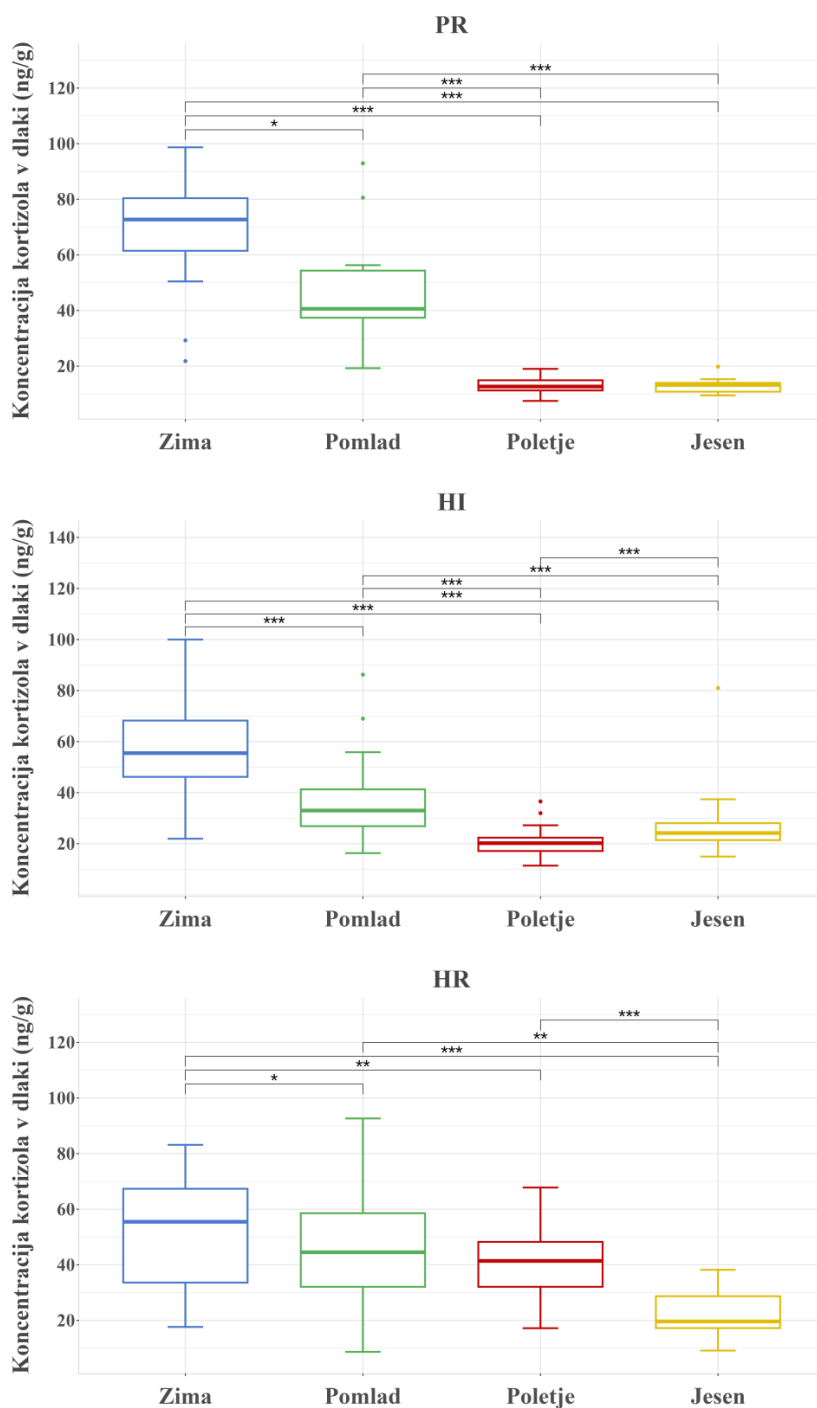
Legend

RP - outdoor, HI - mixed, RH - indoor

Z U testom za neodvisne vzorce po Mannu in Whitneyju med spoloma ob nobenem vzorčenju nismo našli značilnih razlik v koncentraciji kortizola v dlaki ($p = 0,084$). Zaradi tega rezultata v nadaljnji statistični analizi nismo upoštevali spola živali, ampak smo vzorce samcev in samic iz posameznih rej ob posameznih letnih časih združili. Iz slike 4 je razvidno, da imajo samci po večini večje razpone kot samice.

4.3 KONCENTRACIJA KORTIZOLA V DLAKI OB POSAMEZNIH LETNIH ČASIH PO POSAMEZNIH REJAH

Koncentracijo kortizola v dlaki pri prašičih iz posameznih rej prikazuje slika 5. Podatki obeh spolov posameznih vzorčenj so združeni, saj med spoloma ni bilo ugotovljenih značilnih razlik.



Slika 5: Koncentracija kortizola v dlaki ob posameznih letnih časih po posameznih rejah.

Figure 5: Hair cortisol concentration in individual seasons by individual breeds.

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Legend

RP-outdoor, HI-mixed, RH-indoor, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

4.3.1 Reja na prostem (RP)

S Friedmanovim testom za odvisne vzorce smo ugotovili značilno razliko v koncentracijah kortizola v dlaki med posameznimi letnimi časi ($p < 0,001$). Willcoxonov *post hoc* test primerjave parov je pokazal statistično značilno razliko med primerjavami zima-pomlad ($p = 0,01$), zima-poletje ($p < 0,001$), zima-jesen ($p < 0,001$), pomlad-jesen ($p < 0,001$) in pomlad-poletje ($p < 0,001$). Neznačilno razliko smo ugotovili samo pri primerjavi koncentracij kortizola v dlaki med poletjem in jesenjo.

4.3.2 Reja v hlevu z izpustom (HI)

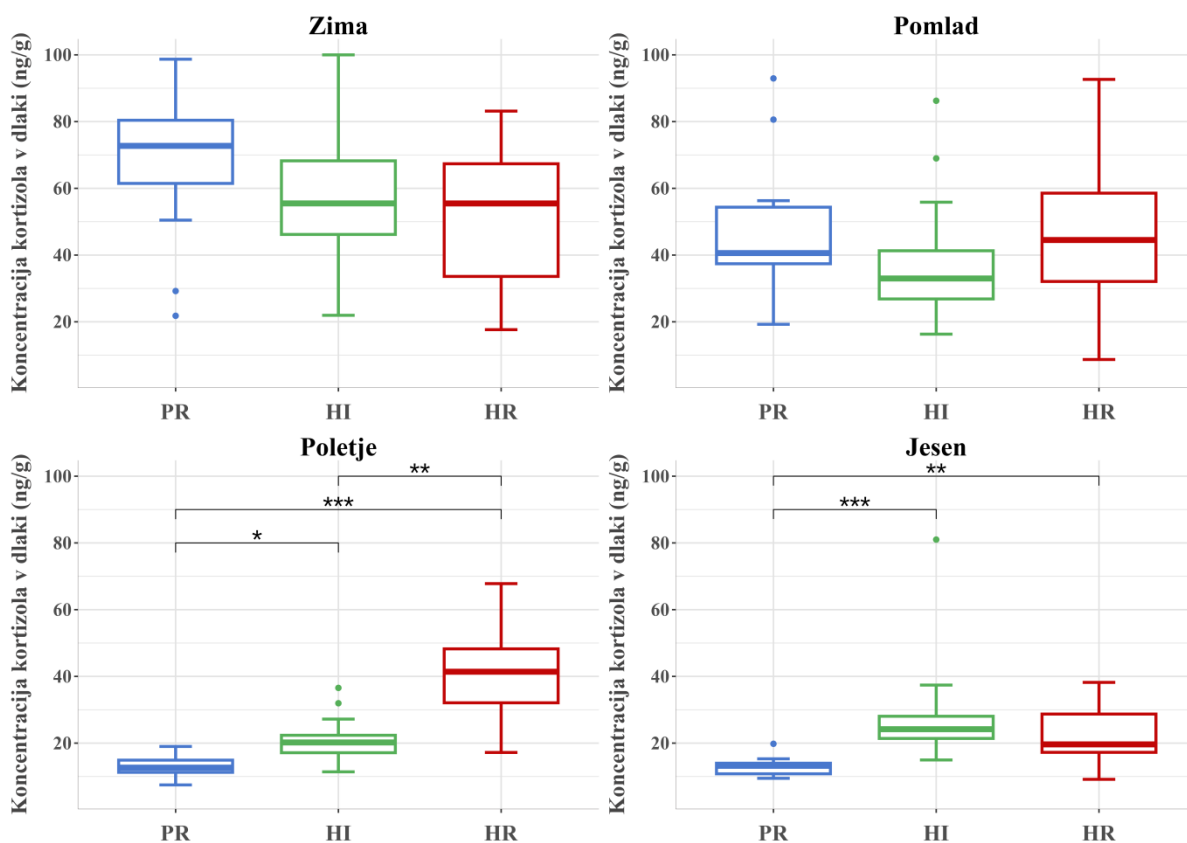
Tudi pri prašičih iz skupine HI smo s Friedmanovim testom za odvisne vzorce ugotovili značilno razliko v koncentraciji kortizola v dlaki med posameznimi letnimi časi ($p < 0,001$). Z Willcoxonovim *post hoc* testom primerjave parov smo ugotovili značilno razliko med primerjavami zima-pomlad ($p < 0,001$), zima-poletje ($p < 0,001$), zima-jesen ($p < 0,001$), pomlad-poletje ($p < 0,001$), pomlad-jesen ($p < 0,001$) in poletje-jesen ($p < 0,001$).

4.3.3 Reja v hlevu brez izpusta (RH)

Podobno smo tudi pri prašičih iz skupine RH s Friedmanovim testom za odvisne vzorce ugotovili statistično značilno razliko v koncentracijah kortizola v dlaki med posameznimi letnimi časi ($p = 0,007$). *Post hoc* test primerjave parov po Willcoxonu je pokazal statistično značilno razliko med primerjavami zima-pomlad ($p = 0,04$), zima-poletje ($p = 0,007$), zima-jesen ($p < 0,001$), pomlad-jesen ($p = 0,001$) in poletje-jesen ($p < 0,001$). Neznačilno razliko smo ugotovili samo pri primerjavi koncentracij kortizola v dlaki med pomladjo in poletjem.

4.4 REJE PO POSAMEZNIH LETNIH ČASIH

Primerjava koncentracij kortizola v dlaki med posameznimi načini reje v vsakem letnem času je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Koncentracija kortizola v dlaki v posameznih rejah po posameznih letnih časih.

Figure 6: Hair cortisol concentration in individual breeds by individual seasons.

Legenda

RP – reja na prostem, HI – reja v hlevu z izpustom, RH – reja v hlevu, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Legend

RP - outdoor, HI - mixed, RH - indoor, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

4.4.1 Zima

S testom vsote rangov po Kruskalu in Wallisu smo našli značilno razliko ($p = 0,04$) v vrednostih koncentracij kortizola v dlaki med rejami v zimskem času, vendar po analizi z Dunnovim *post hoc* testom zaradi korekcije po Bonferroniju statistično značilna razlika med parnimi primerjavami rej ni bila več očitna. V nalogi smo kot mejo statistične značilnosti postavili $p < 0,05$). Rezultat testa po Kruskalu in Wallisu je 0,04, kar se šteje za statistično značilen rezultat v primerjavi vseh treh skupin skupaj, torej nakazuje na prisotnost razlik med rejami v zimskem času. Vendar je v sklopu *post hoc* parnih primerjav z uporabo Dunnovega testa uporabljena korekcija po Bonferroniju, ki mejo značilnosti zniža glede na število parnih primerjav (v tem primeru tri). Po upoštevanju korekcije je meja značilnosti nižja oziroma »bolj stroga« in zato specifične parne primerjave ne kažejo več statistično značilnih razlik, torej niso več manjše od 0,05.

4.4.2 Pomlad

S testom vsote rangov po Kruskalu in Wallisu nismo ugotovili značilnih razlik ($p = 0,17$) med vrednostmi koncentracije kortizola v dlaki med različnimi rejami v spomladanskem obdobju. Zaradi tega analize *post hoc* nismo izvedli.

4.4.3 Poletje

Test vsote rangov po Kruskalu in Wallisu je v poletnem času pokazal statistično značilno razliko ($p < 0,001$) v koncentraciji kortizola v dlaki med posameznimi rejami. S *post hoc* analizo z Dunnovim testom smo ugotovili značilne razlike med vsemi parnimi primerjavami rej in sicer RH – HI ($p = 0,0119$) ter RH – RP ($p < 0,001$) in HI – RP ($p = 0,0034$).

4.4.4 Jesen

Tudi jeseni smo s testom vsote rangov po Kruskalu in Wallisu med rejami našli značilno razliko ($p < 0,001$) med koncentracijami kortizola v dlaki. *Post hoc* analiza z Dunnovim testom je pokazala značilne razlike med rejami RH – RP ($p < 0,001$) ter HI – RP ($p < 0,001$).

5. RAZPRAVA

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, kateri od načinov ekstenzivne reje omogoča prašičem avtohtone pasme krškopoljski prašič čim boljše počutje. Med sabo smo primerjali prašiče iz reje na prostem, reje v hlevu z izpustom in reje v hlevu brez izpusta. Dobro počutje smo vrednotili z oceno parametrov navedenih v vprašalniku (slika 3) in z določanjem koncentracije kortizola v dlaki. Upoštevali smo tudi vpliv letnih časov, zato smo oceno z vprašalnikom in določanje koncentracije kortizola v dlaki izvedli enkrat v vsakem letnem času.

Med koncentracijo kortizola v dlaki pri samicah in samcih kastratih nismo ugotovili značilne razlike (slika 4), kar se sklada z rezultati študij, ki so jih opravili Heimbürge in sod. (2020) ter Zupan in Zanella (2017), ki prav tako niso ugotovili značilnih razlik med spoloma. Zaradi tega smo rezultate samic in samcev (kastratov) iz posamičnih rej obravnavali skupaj.

V vseh treh skupinah prašičev je bila skupna ocena vprašalnika v primerjavi z drugimi letnimi časi pozimi najnižja. V tem času so bili prašiči prepeljani z domače farme na pašo na Vremščici, na Studencu so jih premestili v hlev oziroma v hlev z izpustom. Ob formiranju hierarhije v skupinah je prihajalo do agresivnega vedenja, kar smo opazili v vseh treh skupinah, saj so imeli nekateri prašiči pogrizena ušesa. V skupini RP je imel pozimi vsak deseti prašič pogrizena ušesa, v RH in HI so imeli pogrizena ušesa le posamezni prašiči. V vseh skupinah je bila kot nastilj in kot ustrezen zaposlitveni material prisotna slama (Düpjan in sod., 2021), zato sklepamo, da agresivno vedenje ni posledica nezaposlitve, ampak vzpostavljanja hierarhije. Pri skupinah RH in HI je bilo opaženo premajhno število krmilnikov in napajalnikov glede na število prašičev, zaradi česar bi tudi lahko prihajalo do agresivnega vedenja (D'Alessio in sod., 2023). Prašiči v RH so imeli bistveno večjo talno površino od normativov, zapisanih v Pravilniku o zaščiti rejnih živali (2010). Pri posameznih prašičih v vseh treh skupinah smo pozimi opazili kašljanje, kihanje, izcedek iz nosnic in konjunktivitis, kar je najverjetneje posledica okužb dihal, čemur pripomorejo nizke zunanje temperature. V rejam najbližji meteorološki postaji, v Postojni, je bila februarja, torej v času, ko so bili prašiči vhlavljeni na opazovane lokacije, povprečna zunanja temperatura 2,4 °C, najnižja pa -8,0 °C (Naše okolje: mesečni bilten agencije RS za okolje, 2023a). Optimalna temperatura za 11 tednov stare prašiče je 20 °C (Whittemore in Wathes, 2006). Od opazovanih skupin živali je bila pozimi z vprašalnikom o dobrobiti najnižje ocenjena skupina

RP (79 točk od 95). Poleg že navedenih razlogov so posamezni prašiči v tej skupini imeli tudi umbilikalne/ingvinalne hernije, doživljali so tudi večji temperaturni stres, kar sklepamo iz dejstva, da so bili ob našem prihodu na gospodarstvo nagnjeni.

Čeprav je bila v skupini RP v primerjavi z drugima skupinama pozimi ugotovljena najvišja mediana koncentracije kortizola v dlaki, se statistično ni razlikovala od prašičev iz drugih dveh skupin (slika 6).

Ugotavljanje koncentracije kortizola v dlaki omogoča retrospektivni vpogled v aktivnost nadledvične žleze, torej za obdobje rasti dlake (Sergiel in sod., 2020; Vesel in sod., 2020). S primerjavo koncentracije kortizola v dlaki med opazovanimi skupinami ob prvem vzorčenju še ne moremo vrednotiti primernosti različnih pogojev reje, saj so bili prašiči premeščeni na opazovane lokacije le nekaj dni pred jemanjem vzorcev, zaradi česar prikazani rezultati odražajo aktivnost nadledvične žleze iz časa pred prihodom. Ker prašiči izhajajo iz iste reje, je povsem pričakovano, da nismo ugotovili statističnih razlik takoj po namestitvi na nove lokacije. Med živalmi smo ugotovili veliko variabilnost v koncentraciji kortizola v dlaki. Podobne ugotovitve opisujejo tudi Bacci in sod. (2014). Variabilnost je najverjetneje posledica individualnih razlik v intenzivnosti aktivacije osi HPA v različnih situacijah, kot tudi morebitne kontaminacije dlake s slino ali izločki drugih prašičev iz skupine. Na koncentracijo kortizola vpliva tudi starost živali (Heimbürge in sod., 2020).

Tudi spomladi smo z vprašalnikom z najnižjim številom točk ovrednotili RP. V tem času smo pri več kot 30 % živali opazili sončne opekline. Poleg tega so bili prašiči po velikosti kljub enaki starosti neizenačeni, pri posameznih smo opazili znake respiratornih obolenj, poleg tega so imeli prašiči glede na njihovo število na voljo premalo krmilnih mest. Neizenačenost prašičev je lahko posledica neenakega dostopa do krmilnikov. Nenavadno je, da smo pri prašičih opazili sončne opekline, saj so imeli vedno možnost umika v zavetje oziroma senco. Z vprašalnikom smo v tem času najbolje ocenili HI (tabela 3). Bolje od drugih dveh skupin je bila ocenjena predvsem na področju zdravstvenega varstva, saj prašiči v HI niso kazali respiratornih obolenj in so bili brez poškodb kože. Poleg naštetega ima HI v primerjavi z RP zadostno število napajalnikov in krmilnikov glede na število živali. V primerjavi z RH je bilo v HI manj prašičev neizenačenih po velikosti, prav tako v notranjih prostorih te skupine ni bilo prahu ali vonja po amonijaku.

V RH smo opazili več kot 30 % neizenačenih prašičev, pri posameznih znake agresije, nekateri so imeli poškodbe kože. Posamezni prašiči so kašljali, kar je verjetno posledica prahu v zraku in amonijaka v hlevu.

Spomladi so bile koncentracije kortizola v vseh skupinah značilno nižje kot pozimi, a višje kot poleti in jeseni (slika 5). Predvidevamo, da je to posledica tako endogenih kot eksogenih dejavnikov. Ugotovljeno je bilo, da se s starostjo bazalna vrednost kortizola niža (Heimbürge in sod., 2020), klimatski pogoji, predvsem temperatura, pa po drugi strani spomladi omogočajo boljše življenjske pogoje. Najvišja mediana in tudi največja variabilnost podatkov sta bili ugotovljeni pri skupini RH, najnižja pa pri HI. Ti rezultati se delno ujemajo z rezultati, ki smo jih dobili z izpolnjevanjem vprašalnika, kjer so bili najboljši pogoji ugotovljeni pri skupini HI. Z gotovostjo tega ne moremo potrditi, saj v tem obdobju med posameznimi skupinami, torej načini reje, nismo ugotovili značilnih razlik (slika 6).

Poleti je bil nizek nivo dobrobiti ugotovljen pri skupini RP, saj je z vprašalnikom ponovno prejela najnižje število točk. Opazili smo blage sončne opekline, kljub temu da so prašiči imeli možnost umika v senco. Voda v napajalnikih ni bila iz vodovodnega sistema in je bila zato vprašljive kakovosti, nastilj je bil umazan z blatom in urinom.

Najvišje število točk je poleti dosegla RH. V primerjavi s HI v RH živali niso imele večjih poškodb kože in se ob prihodu človeka niso vznemirile. V primerjavi z RP živali v RH niso imele sončnih opeklin, ves čas so imele nastilj, dovolj krme, voda v napajalnikih je bila iz vodovodnega sistema. V RH so posamezne živali imele drisko, posamezni prašiči so bili popraskani. Vsak četrti prašič je bil manjši od ostalih, kar je verjetno posledica premajhnega števila krmilnikov glede na število živali. Pri živalih iz skupine HI smo opazili močne sončne opekline, kljub temu da so prašiči imeli možnost umika v zavetje. Manj kot 10 % živali je bilo neizenačenih, pri posameznih smo opazili poškodbe kože, pri dveh prašičih pa abscese. Neizenačenost prašičev je verjetno posledica premajhnega števila krmilnikov.

Podobno kot pri drugih letnih časih smo tudi jeseni najslabše ocenili pogoje v RP. Posamezni prašiči so bili še vedno manjši od ostalih, nekateri so šepali, vsak četrti je imel poškodbe kože, posamezni so imeli drisko, kar bi lahko bila posledica vprašljive kakovosti vode, nastilja ni bilo, krma je bila razsuta. Z največ točkami smo jeseni ovrednotili HI. Bivalni pogoji so bili v HI boljši kot v RP, saj je bila voda v HI iz vodovodnega sistema, živali so

imele nastilj in krma ni bila razsuta. Posamezni prašiči so imeli drisko in so šepali, zaradi tega je verjetno prišlo do še večje neizenačenosti. Več kot 30 % prašičev je imelo poškodbe kože. V RH so bile pri živalih vidne posledice agresije (rane, praske) in enako kot v drugih dveh skupinah so bili posamezni prašiči neizenačeni, pri posameznih smo opazili šepanje in drisko. V hlevu je bil prah in blag vonj po amonijaku.

Na podlagi ocen iz vprašalnika lahko zaključimo, da je dobrobit pozimi najvišja v HI in RH, spomladi v HI, poleti je najvišja v RH, jeseni pa v HI.

Poleti in jeseni so bile koncentracije kortizola značilno nižje v primerjavi z zimo in pomladjo (slika 5). Poleti smo pri prašičih v HI in RP opazili sončne opekline, kljub temu da so prašiči imeli dostop do zavetja oziroma sence. Povprečna temperatura poleti v Postojni je bila 20,6 °C in maksimalna 32,2 °C (Naše okolje: mesečni bilten agencije RS za okolje, 2023b). Vpliv visokih temperatur se ni odražal na koncentraciji kortizola v dlaki. Optimalna temperatura za šest do osem mesecev stare prašiče je namreč 16 do 18 °C (Whittemore in Wathes, 2006). Koncentracija kortizola v dlaki je bila v vzorcih, odvzetih poleti in jeseni, značilno nižja pri RP v primerjavi s HI in RH, kar kaže na ugodnejše rejske razmere v času pozne pomladi in poletja (v času rasti dlake) pri prašičih, ki so jih vzrejali zunaj.

Na podlagi rezultatov vprašalnika ovržemo našo prvo hipotezo, saj je dobrobit prašičev v RP bila v vseh štirih letnih časih ocenjena najslabše. Z izpolnjevanjem vprašalnika je namreč RP v primerjavi s HI in RH prejela najnižje število točk. Dobrobit je bila pozimi najbolje ocenjena v HI in RH, spomladi v HI, poleti v RH in jeseni v HI. Koncentracije kortizola v dlaki v vseh letnih časih delno potrjujejo našo drugo hipotezo, saj je bila koncentracija kortizola poleti in jeseni najnižja v RP. Pozimi in spomladi pa ni bilo značilnih razlik.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se rezultati, pridobljeni z izpolnjevanjem vprašalnika, delno ujemajo z oceno dobrobiti, pridobljeno na osnovi ugotavljanja koncentracije kortizola v dlaki. Predvidevamo, da se metodi dopolnjujeta, saj z vprašalnikom ocenimo trenutno počutje prašičev, določanje koncentracije kortizola v dlaki pa omogoča vpogled v daljše obdobje.

Z izpolnjevanjem vprašalnika prikažemo odnos človek-žival, konflikte med prašiči znotraj skupine in ovrednotimo osnovne rejske pogoje, kot so temperatura, prostor ter dostop do hrane in vode. Na ta način lahko takoj dobimo vpogled v trenutno dobrobit skupine prašičev.

Z rezultati določanja koncentracije kortizola v dlaki dobimo vpogled v aktivnost nadledvične žleze skozi daljše obdobje in s tem vpliv vsote najrazličnejših endogenih in eksogenih dejavnikov, s čimer lahko ocenimo dobrobit v opazovanem obdobju (Vesel in sod., 2020). Zaradi velike variabilnosti v koncentraciji kortizola v dlaki med posameznimi prašiči, ki izhajajo iz enakih rejskih pogojev, ni mogoče določiti referenčnih vrednosti, ki bi jih lahko uporabili kot mejo med dobrobitjo in tveganjem za slabo počutje. Vrednotenje dobrobiti z ugotavljanjem koncentracije kortizola v dlaki se lahko izvaja le, kadar se ta podatek primerja med dvema ali več skupinami prašičev, ki izhajajo iz različnih rejskih pogojev, ob čemer se kakovost reje ovrednoti s primerjavo koncentracije kortizola v dlaki med skupinami ob izvedbi ustrezne statistične analize. Iz navedenega izhaja tudi, da individualno vrednotenje dobrobiti z ugotavljanjem kortizola v dlaki ne omogoča relevantne ocene. Kombinacija rezultatov obeh metod se lahko uporabi kot osnova za izvajanje izboljšav reje.

V naši raziskavi je bil vpliv letnih časov na koncentracijo kortizola večji kot vpliv starosti, saj Heimbürge in sod. (2020) v svoji študiji opisujejo padec koncentracije kortizola v dlaki pri prašičih, starih med dva in deset tednov, nato pa zvišanje koncentracije kortizola po desetem tednu starosti. Rezultati naše raziskave tega ne potrjujejo. V omenjeni raziskavi avtorji opisujejo koncentracijo kortizola glede na starost prašičev, niso pa upoštevali vpliva letnih časov. Ob upoštevanju rezultatov obeh raziskav lahko predvidevamo, da ima na našem geografskem področju poleg starosti velik vpliv na koncentracijo kortizola tudi letni čas, saj se tekom leta pojavijo velika nihanja v temperaturi, svoj vpliv ima tudi fotoperioda (Cestnik, 1996; Martinez-Miro in sod., 2016; Petroff in Greco, 2020), kar vpliva na presnovne procese, ki jih regulirajo glukokortikoidi.

Ob upoštevanju rezultatov izpolnjevanja vprašalnika in določanja koncentracije kortizola v dlaki lahko zaključimo, da bi bilo najprimerneje kombinirati rejo v hlevu in rejo na prostem glede na letni čas; z rejo v hlevu se izognemo izpostavljenosti ekstremnim temperaturam, z rejo na prostem pa v zmernih vremenskih razmerah omogočimo naravno vedenje živali (Ludwiczak in sod., 2021). Kot kažejo rezultati naše raziskave je pomemben dejavnik tudi možnost hkratnega dostopa do krme in vode vsem prašičem v skupini in ustrezna hlevska in pašna infrastruktura.

6. SKLEPI

- Ocena, pridobljena z izpolnjevanjem vprašalnika o dobrobiti, nakazuje na najvišjo raven dobrobiti v HI.
- Način reje vpliva na koncentracijo kortizola v dlaki prašičev. Pozimi je glede na koncentracijo kortizola v dlaki prašičev najbolj optimalen način RH, spomladi HI, poleti in jeseni pa RP.
- Ocena dobrobiti, pridobljena z izpolnjevanjem vprašalnika o dobrobiti in z določanjem koncentracije kortizola v dlaki, lahko služi kot osnova za uvedbo izboljšav reje.

7. POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo želeli preučiti, kateri način reje, reja na prostem, reja v hlevu z izpustom in reja v hlevu brez izpusta, je z vidika dobrobiti za prašiče najbolj ugoden. V raziskavo smo vključili 51 krškopoljskih prašičev, ki so bili nastanjeni v navedenih treh načinih reje. V vsaki reji smo enkrat ob vsakem letnem času – pozimi, spomladi, poleti in jeseni – ocenjevali dobrobit z izpolnjevanjem vprašalnika, čemur je sledil odvzem vzorcev dlak za določanje koncentracije kortizola. V vprašalniku o dobrobiti smo zajeli štiri sklope: obnašanje, zdravstveno varstvo, bivalni pogoji in okoljski parametri. Koncentracijo kortizola smo v predhodno pripravljenih ekstraktih dlake določili s komercialnim kompletom, ki temelji na metodi ELISA.

Na podlagi vprašalnika je bila dobrobit prašičev v reji na prostem v vseh štirih letnih časih ocenjena z najnižjim številom točk. Dobrobit prašičev je bila najvišje ocenjena pozimi v hlevu z izpustom in v hlevu brez izpusta, spomladi v hlevu z izpustom, poleti v hlevu brez izpusta in jeseni v hlevu z izpustom.

S primerjavo koncentracije kortizola v dlaki med kastrati in samicami nismo ugotovili značilnih razlik. S primerjavo koncentracije kortizola in njegovih presnovkov v dlaki v vseh treh rejah prašičev smo ugotovili, da je bila koncentracija kortizola v dlaki v vseh treh rejah najvišja pozimi, med živalmi iz posameznih rej pa se ni značilno razlikovala. Ugotavljanje koncentracije kortizola v dlaki omogoča retrospektivni vpogled v aktivnost nadledvične žleze za obdobje rasti dlake, zato na podlagi primerjave koncentracije kortizola v dlaki med opazovanimi skupinami ob prvem vzorčenju še ne moremo vrednotiti primernosti različnih pogojev reje. Prašiči so bili premeščeni na opazovane lokacije le nekaj dni pred prvim jemanjem vzorcev, zaradi česar prikazani rezultati odražajo aktivnost nadledvične žleze iz časa pred prihodom.

Spomladi so bile koncentracije kortizola v vseh rejah značilno nižje kot pozimi, a višje kot poleti in jeseni. Predvidevamo, da je to posledica klimatskih pogojev, predvsem temperature in staranja prašičev. Poleti in jeseni so bile koncentracije kortizola značilno nižje v primerjavi z zimo in pomladjo. Poleti smo pri prašičih v izpustu in pri prašičih na prostem opazili sončne opekline. Povprečna zunanja temperatura je bila višja od optimalne temperature za prašiče, vendar se to ni odražalo na koncentraciji kortizola v dlaki. Glede na rezultate raziskave lahko

trdimo, da ima način reje vpliv na koncentracijo kortizola, vendar nima enakega vpliva v vseh letnih časih.

Rezultati, ki smo jih pridobili z izpolnjevanjem vprašalnika, se delno ujemajo z oceno dobrobiti, pridobljeno z ugotavljanjem kortizola v dlaki. Z izpolnjevanjem vprašalnika o dobrobiti ocenimo trenutno stanje prašičev, z določanjem koncentracije kortizola v dlaki pa ocenimo aktivnost osi HPA skozi daljše obdobje.

Glede na rezultate študije je v zimskem času za prašiče najbolj optimalen način reje hlev z izpustom ali hlev brez izpusta. To lahko sklepamo glede na rezultate vprašalnika o dobrobiti, s katerim smo pozimi ugotovili najvišjo raven dobrobiti v obeh rejah v hlevu, hkrati so prašiči v teh dveh skupinah pozimi imeli nižjo koncentracijo kortizola v dlaki kot prašiči na prostem. Sklepamo, da je spomladi za prašiče najbolj optimalen način reje hlev z izpustom, saj smo s pomočjo vprašalnika o dobrobiti v hlevu z izpustom ugotovili višjo raven dobrobiti kot v reji na prostem in reji v hlevu, koncentracije kortizola v dlaki prašičev v hlevu z izpustom so bile spomladi nižje kot v drugih dveh rejah. Enako ne moremo trditi za rezultate v poletnih in jesenskih mesecih, saj smo pri prašičih na prostem z vprašalnikom ugotovili najnižjo raven dobrobiti, hkrati so bile tudi koncentracije kortizola pri prašičih na prostem poleti in jeseni nižje kot pri prašičih v hlevu oziroma v hlevu z izpustom. Ocena dobrobiti z izpolnjevanjem vprašalnika v kombinaciji z določanjem koncentracije kortizola v dlaki je lahko dobra osnova za izvajanje izboljšav rej prašičev.

8. ZAHVALE

Zahvaljujema se financerjem, ki so omogočili našo raziskavo. Delo je bilo izvedeno v okviru mednarodnega projekta z naslovom RObust Animals in sustainable Mixed FREE-range systems (ROAM-FREE), financiranega s sredstvi Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP), s proračunske postavke 180037 ERA NET – Kmetijstvo in v okviru dveh programskih skupin, in sicer P4-0053 (Endokrini, imunski in encimski odzivi pri zdravih in bolnih živalih) in P4-0092 (Zdravje živali, okolje in varna hrana), financiranih s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS). Prav tako se zahvaljujema za uporabljeni vprašalnik za oceno dobrobiti, ki je bil razvit v okviru CRP V4-2024 z naslovom Reja domačih živali z nadgradnjo dobrobiti živali v skladu z družbenimi zahtevami, ki je bil financiran s strani ARIS in MKGP.

Radi bi se zahvalili mentorju izr. prof. dr. Tomažu Snoju, dr. vet. med., in somentorici izr. prof. dr. Marini Štukelj, dr. vet. med., za vse deljeno znanje, pomoč, potrpežljivost, usmerjanje in spodbudo pri pisanju raziskovalne naloge.

Za pomoč pri statistiki in delu v laboratoriju se iskreno zahvaljujema asist. Tilnu Vaketu, dr. vet. med. Hvala tudi Boštjanu Drolcu za vso pomoč in usmerjanje pri delu v laboratoriju.

Hvala zaposlenim na Kliniki za prežvekovalce in prašiče Veterinarske fakultete ter študentom veterine, ki so nama pomagali pri vzorčenjih.

Zahvaljujema se rejcem, ki sta nas sprejela na svojih kmetijah.

Prof. dr. Robertu Frangežu, dr. vet. med., se zahvaljujema za prijazno deljenje uporabne literature.

Zahvaljujema se knjižničarkam za pregled literature in ostalo pomoč.

Za lektoriranje besedila se zahvaljujema slovenistki Evi Frankol.

Hvala najinima družinama za vso podporo. Nenazadnje se zahvaljujema druga drugi za spodbudo skozi celoten proces nastajanja raziskovalne naloge.

9. LITERATURA

1. Anderson DE, Yves Mulon P. Anesthesia and surgical procedures in swine. In: Zimmerman JJ, eds. Diseases of swine. 11th ed. Hoboken: Wiley, 2019: 171–96.
2. Bacci ML, Nannoni E, Govoni N, et al. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod Biol* 2014; 14(3): 218–23.
doi: 10.1016/j.repbio.2014.06.001
3. Brambell FWR. Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive husbandry systems. London: H. M. Stationary office, 1965: 85.
4. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N, et al. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 57–61.
5. Cestnik V. Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1996: 16–19; 105–8.
6. D'Alessio RM, Hanlon A, O'Driscoll K. Comparison of single- and double-spaced feeders with regard to damaging behavior in pigs. *Front Vet Sci* 2023, 10: 1073401
doi: 10.3389/fvets.2023.1073401
7. Dovč A. Reja domačih živali z nadgradnjo dobrobiti živali v skladu z družbenimi zahtevami: zaključno poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu v okviru ciljnega raziskovalnega programa (CRP) "zagotovimo.si hrano za jutri" 2011-2020. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2023.
8. Düpjan S, Moscovice LR, Puppe B. The role of enrichment in optimizing pig behaviour and welfare. In: Edwards S, ed. Understanding the behaviour and improving the welfare of pigs. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2021: 401–28.
doi:10.19103/AS.2020.0081.11
9. Früh B. Organic pig production in Europe: health management in common organic pig farming. Research Institute for Organic Agriculture (FiBL) 2011: 1–12.
10. Grandin T. The importance of measurement to improve the welfare of livestock, poultry and fish. In: Grandin T, ed. Improving animal welfare: a practical approach. 3rd ed. Wallingford: CABI, 2021a: 19–45.

11. Grandin T. An introduction to implementing an effective animal welfare program. In: Grandin T, ed. *Improving animal welfare: a practical approach*. 3rd ed. Wallingford: CABI, 2021b: 1–18.
12. Heimbürge S, Kanitz E, Tuchscherer A, Otten W. Within a hair's breadth – factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen Comp Endocrinol* 2020; 288: 18. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.113359
13. Johnson AK, Colpoys JD, Edwards-Callaway LN, et al. Behavior and welfare. In: Zimmerman JJ, eds. *Diseases of swine*. 11th ed. Hoboken: Wiley, 2019: 17–41.
14. Karaer MC, Čebulj-Kadunc N, Snoj T. Stress in wildlife: comparison of the stress response among domestic, captive and free-ranging animals. *Front Vet Sci* 2023; 10: 1167016. doi 10.3389/fvets.2023.1167016
15. Kovačič U, Sketelj J. Nespecifični obrambni odziv organizma na stres. In: Pirkmajer S, ed. *Temelji patološke fiziologije*. 5. izd. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2021: 47–50.
16. Leenhouders J. Breeding for organic and low input pig production systems. *LowInputBreeds technical note* 2014; 2–3.
17. Ludwiczak A, Skrzypczak E, Składanowska-Baryza J, Stanisław M, Słószarz P, Racewicz P. How housing conditions determine the welfare of pigs. *Animals* 2021; 11(12): 3484. doi: 10.3390/ani11123484
18. Martínez-Miró S, Tecles F, Ramón M, et al. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res* 2016; 12(1): 171. doi: 10.1186/s12917-016-0791-8
19. Moberg GP. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, eds. *The biology of animal stress: basic principles and applications for animal welfare*. Wallingford: CAB International, 2000: 1–22.
20. Moss R. Other clinical diagnostic methods. In: Moss R, ed. *Livestock health and welfare*. Harlow: Longman, 1992: 51–87.

21. Nadlučnik E, Golinar Oven I, Tomažič I, Plut J, Dovč A, Štukelj M. Discrepancies between farmers' perceptions and actual animal welfare conditions on commercial pig farms. *Front Vet Sci* 2022; 9: 1010791.
doi: 10.3389/fvets.2022.1010791
22. Naše okolje: mesečni bilten agencije RS za okolje 2023a, 30(2).
23. Naše okolje: mesečni bilten agencije RS za okolje 2023b, 30(7).
24. Nedić S, Pantelić M, Vranješ-Đurić S, et al. Cortisol concentrations in hair, blood and milk of Holstein and Busha cattle. *Slov Vet Res* 2017; 54(4): 16372.
doi: 10.26873/SVR-398-2017
25. Nelson RJ, Kriegsfeld LJ. An introduction to behavioral endocrinology. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2017: 581–628.
26. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: advances and problems. *Physiol Behav* 2019; 199: 229–43.
doi: 10.1016/j.physbeh.2018.11.021
25. Petroff BK, Greco DS. Endocrine glands and their function. In: Klein BG, ed. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 6th ed. St. Louis: Elsevier, 2020: 394–427.
26. Piibor J, Jeremejeva J, Leming R, Arney D. Comparing health and welfare of pigs farmed in conventional and in organic systems housed indoors. *Vet Zootech* 2022; 80(1): 1–9.
27. Pravilnik o zaščiti rejnih živali. *Ur List RS* 2010; 20(51): 7592–603. (28. 6. 2010).
28. Sergiel A, Cattet M, Kapronczal L, et al. Do follicles matter? Testing the effect of follicles on hair cortisol levels. *Conserv Physiol* 2020; 8(1): coaa003.
doi: 10.1093/conphys/coaa003
29. Sharpley CF, McFarlane JR, Slominski A. Stress-linked cortisol concentrations in hair: what we know and what we need to know. *Rev Neurosci* 2011; 23(1): 111–21.
doi: 10.1515/RNS.2011.058
30. Silbernagl S, Lang F. *Color atlas of pathophysiology*. Stuttgart: Thieme, 2000: 268.
31. Šalehar, A. Krškopoljski prašič: iskanje ostankov, ohranjanje in osvežitev pasme v letih 1990-2003. *Slovenj Gradec: Kmetijska založba*, 2015: 99–104.

32. Vesel U, Pavič T, Ježek J, Snoj T, Starič J. Welfare assessment in dairy cows using hair cortisol as a part of monitoring protocols. *J Dairy Res* 2020; 87(S1), 72–8.
doi: 10.1017/S0022029920000588
33. Welfare Quality Network. The Welfare Quality® assessment protocol for cattle. Version 3.0. Monells: Welfare Quality Network, 2023.
<https://www.welfarequalitynetwork.net/media/1319/dairy-cattle-protocol.pdf> (5. 6. 2024)
34. Whittemore C, Wathes C. Environmental management of pigs. In: Kyriazakis I, eds. *Whittemore's science and practice of pig production*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006: 533–92.
doi: 10.1002/9780470995624.ch17
35. Williams, CH. A review: malignant hyperthermia-a genetic disease of sodium channel function. *FASEB J* 2020; 34(suppl, 1):1–1 .
doi: 10.1096/fasebj.2020.34.s1.04142
36. Wright KD, Hickman R, Laudenslager ML. Hair cortisol analysis: a promising biomarker of HPA activation in older adults. *Gerontologist* 2015; 55 (suppl. 1): 140–5.
doi: 10.1093/geront/gnu174
37. Zupan M, Zanella AJ. Peripheral regulation of stress and fear responses in pigs from tail-biting pens. *R Bras Zootec* 2017; 46(1): 33–8.
doi: 10.1590/S1806-92902017000100006