N139/16

Jordbruks verket

Ansökan om etiskt godkännande av djurförsök

Tidigare inskickade versioner av ansökan

Ansökan har inte skickats in tidigare

Innehållsförteckning

1 **Grunduppgifter** 3
1.1 Försöksledare (Sökande) 3
1.2 Tillstånd att använda försöksdjur 3
1.3 Etisk nämnd 3
1.4 Försökets titel 4
1.5 Övriga upplysningar 4
2 **Syfte m.m** 5
3 **Djurarter m.m** 8
3.1 rodents 8
4 **Försökets genomförande** 9
4.1 Försöksgrupp: Försöksgrupp 1 9
4.1.1 Undergrupp: Wild type, Wild type + stress, KO , KO + stress 9
5 **Undantag, sammanfattning** 21

N139/16

2 Syfte m.m

Syftet med försöket enligt Jordbruksverkets föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur

- ☑ 1 Grundforskning
- ☑ 2 Forskning om vilka effekter sjukdomar, ohälsa eller annat avvikande tillstånd har på människor, djur eller växter samt hur de ska undvikas, förebyggas, diagnosticeras eller behandlas
- ☐ 3 Forskning som innebär utvärdering, påvisande, reglering eller modifiering av fysiologiska tillstånd hos människor, djur eller växter
- ☐ 4 Forskning som syftar till förbättring av djurens välfärd
- ☐ 5 Utveckling, tillverkning eller testning av kvalitet, effekt och säkerhet av läkemedel, livsmedel, foder och andra ämnen eller produkter; detta gäller endast i de syften som avses i 2-4
- ☐ 6 Forskning som syftar till artskydd
- ☐ 7 Skydd av den naturliga miljön för att bevara människors eller djurs hälsa eller välfärd
- ☐ 8 Rättsmedicinska undersökningar
- ☐ 9 Användning i högskoleutbildning eller i utbildning som syftar till att förvärva, upprätthålla eller utveckla yrkesfärdigheter under förutsättning att användningen framgår av utbildningens kursplaner, och är nödvändig med hänsyn till syftet med utbildningen.
- ☐ 10 Upprätthållande av kolonier av genetiskt förändrade djur som inte används i andra försök
- ☐ 11 Annat - gäller endast för försök som sannolikt inte orsakar lidande i lika stor eller större utsträckning än ett nålstick som utförts enligt god veterinärmedicinsk praxis

Beskrivning av syftet

Beskrivning av vad försöket syftar till att uppnå, ta reda på, fastställa eller framställa genom att utföra detta försök. Syftet bör vara specifikt för detta försök samt entydigt, realistiskt och genomförbart. Syftet ska inte förväxlas med nyttan med försöket, som angetts nedan.

Depression är en vanlig psykisk störning och är den vanligaste orsaken till funktionsnedsättning i världen. Omkring 350 miljoner människor i alla åldrar lider av depression. Depression orsakas vanligtvis av en interaktion mellan miljöfaktorer och en underliggande genetisk komponent. En av de mest accepterade teorierna bygger på att depression triggas av tidiga motgångar i livet. Därför är det viktigt att bättre förstå hur tidiga negativa upplevelser i livet kan utlösa eller förvärra depressiva symtom genom att studera depression i djurgenetiska modeller.
En ökande mängd evidens indikerar att negativa händelser under barndomen är förknippade med ökad risk för utveckling av psykiska störningar i vuxen ålder. För att försöka förstå neurobiologin bakom depression har djurmodeller återspeglande tidig livsstress utvecklats i primater och gnagare.
Länken mellan tidig stress i livet och affektiva störningar är relevant i för neurodegenerativa sjukdomar eftersom de flesta patienterna med neurodegenerativa sjukdomar uppvisar emotionella och kognitiva brister. Studier som syftar till att belysa tidig stress i livet och dess roll i uppkomst och utvecklingen av neurodegenerativa sjukdomar som Parkinsons sjukdom (PD) har visat att tidig livsstress gör att dopaminerga neuroner lättare degenererar vid exponering för giftiga medel som inducerar PD. Effekten av stress tidigt i livet har inte studerats i djurgenetiska modeller för neurodegenerativa sjukdomar.
Detta projekt kommer fokusera på att undersöka emotionella, sociala och kognitiva beteenden i genetiska mus- och råttmodeller för depression eller neurodegenerativa sjukdomar. Vi kommer att studera djuren både under normala och stressade situationer. Vi kommer att använda en modell som är baserad på att begränsat bomaterial inducerar tidig livsstress. Karaktärisering av beteende kommer att ske baserat på följande parametrar; ångest, depression, sällskaplighet, inlärningsförmåga och minne genom att använda standardiserade beteendetester. Beroende på vilket beteende som fås kommer vi eventuellt använda en lämplig antidepressiv i efterförloppet av exponeringen för stress. Vi förväntar oss att behandling med en lämplig antidepressiv kommer att vända effekterna av tidig livsstress. Denna studie kommer att belysa betydelsen av interaktionen mellan arv och miljö vid psykiatriska symptom hos relevanta transgena djur. Vi strävar också efter att hitta en lämplig substans som skulle kunna förhindra uppkomsten av psykiatriska symptom i genetiska gnagarmodeller för neurodegenerativa sjukdomar.

Svårhetsgrad

Avsevärd

Beskrivning av försökets slutpunkt

Slutpunkten är det tillfälle då försöksledaren planerar att avsluta försöket och inte göra några fler observationer. Slutpunkten är den tidpunkt där försöksledaren utgår ifrån att ha uppnått syftet med försöket. Den kan anges som en viss tidsperiod (t.ex. djuren går i försöket över en viss tid) eller när något specifikt händer (t.ex. djuren utvecklar vissa symtom eller visar ett visst beteende). Slutpunkten ska inte förväxlas med avbrytningspunkten som är den i förväg satta gränsen för ett djurs lidande då djuret av djurskyddsskäl ska tas ur ett djurförsök oavsett om försökets slutpunkt har uppnåtts.

Beroende av experimentets upplägg sker försökets slutpunkt antingen 30 minuter efter det sista beteendetestet eller 30 minuter efter en akut injektion av thallium. Försökets slutpunkt sker vid max 16 månaders ålder. Avlivningsmetoder är beskrivna senare i denna ansökan.

Beskrivning av nyttan för människa, djur eller miljön

Beskrivning av nyttan för människa, djur eller miljö. Det bör även angetts på vilket sätt resultaten väntas få betydelse för den medicinska eller biologiska utvecklingen. Om försöket innebär grundforskning bör det vara beskrivet vilka framsteg eller nya rön som kan förväntas på längre sikt. Om försöket innebär en fortsättning på eller en upprepning av ett tidigare försök bör det här vara beskrivet vilka tidigare resultat forskaren har kommit fram till samt motiverad varför det är nödvändigt att fortsätta eller upprepa försöket.

Alla valda tester är standardtester vid studier av dessa sjukdomar. De presenterar en god prediktiv, nominell och konstruktiv validitet. Anledningen att välja olika tester som analyserar ett specifik beteende (t.ex. "open field test" och "light-dark box" för ångest) är att dessa tester är känsliga för specifika klasser av läkemedel, men inte för alla. Därför behöver vi olika tester.

Egen etisk avvägning

Egen beskrivning hur sökande har resonerat när de har kommit fram till att nyttan med försöket överväger lidandet för djuren.

Vi förväntar oss att resultaten kommer att bidra till karakterisering av nya och potentiellt viktiga patologiska mekanismer bakom depressionsrelaterade tillstånd som kanske kan leda till nya rön för behandling. Försöken förväntas också ge insikt i hur miljömässiga och genetiska faktorer samverkar med neurodegenerativa faktorer för att orsaka egentlig depression.

Beskrivning av alternativa metoder

Beskrivning av varför djur måste användas för att uppnå syftet med försöket, vilka eventuella alternativa metoder som kommer att användas, vilka metoder som har övervägts men som inte är möjliga att använda samt vilka databaser som har använts vid sökande efter alternativa metoder.

Möss är än så länge den enda väletablerade art där transgena tekniker kan tillämpas för studier av komplexa neuronala funktioner som är störda vid depression, ångest och PD. För att kunna klarlägga mekanismerna som ligger bakom serotonerga, dopaminerga, och glutamaterga funktioner ur ett kliniskt perspektiv behöver man genomföra heldjursstudier. Detta är den enda möjligheten att förstå nervbanornas kopplingar och hur deras moduleringar påverkar biokemiska och beteendemässiga funktioner. För att få en ännu mer detaljerad molekylär förståelse och använda så få djur som möjligt så kommer emellertid dessa studier att kompletteras med experiment i primära neuronalkulturer samt studier i cellinjer.

Beräkning av antalet djur

Förklaring av principerna hur forskaren har kommit fram till det antalet djur som ska användas, t.ex. statistiska beräkningar samt hur det är säkerställt att så få djur som möjligt kommer att användas.

Mus: 2000 (400 / år) , råttor 1000 (200 / år)

N139/16

3 Djurarter m.m

3.1 rodents

Antal: 3000

Motivering av valet av djurart

Jag kommer att använda mig av mutanta möss mot TAAR1, som påverkar monoaminerg neurotransmission. Mus är standardmodell för studiet av gemetisk variation på däggdjur. Mössen kommer att vara av 129Sv och C57BI6-bakgrund i olika korsningsvarianter. Jag kommer att använda mig av mutanta möss mot gener som påverkar monoaminerg neurotransmission t.ex p11, STAT3, TAAR1, GluR1, SI00beta, Nurr1, SNCA, krox24, GPR37, GPR37L1, Tau, Tfam, Lmxla och Lmxlb,. Ingen av de här djurstammarna uppvisar stora basala avvikelser vad det gäller födointag, vikt eller fertilitet. Nurr1, Lmx1a och Lmx1b är gener som är involverade i nervsystemets utveckling, därför kommer dessa djur vara vuxna vid inaktivering av dessa gener. Tfam är en mitokondriell transkriptionsfaktor som i äldre möss spelar en viktig roll för nervcellernas metabolism. SNCA och Tau är proteiner som reglerar cellernas struktur och ärinvolverade vid en rad olika neurodegenrativa sjukdomar. p11 och S100beta djuren har vissa milda emotionella störningar och är något deprimerade. Detta kan antas då mössen inte väljer att dricka sockerlösning framför vanligt vatten. En mus med normal funktion av genen väljer istället den sötade drycken, vilket talar för att djuret har en förmåga att känna välbehag. Det kommer därför alltid finnas flera djur i varje bur för att motverka stress pga. isolering samt berikning i burarna. I vissa fall korsas p11-djuren med stammar som uttrycker CRE-rekombinas under tex D1R- eller D2R-promotorerna eller tTA under tex CamKII-promotorn för att selektivt sänka eller höja nivåerna av p11 i specifika hjärnregioner. GluR1- samt Krox24-djuren har vissa störningar i minnesförmåga och har vissa svårigheter att upprepa inlärda beteenden. GPR37 och GPR37L1-djuren har ingen basal fenotyp. Tau muterade möss kan utveckla minnesproblem med stigande ålder. TAAR1-djuren har ingen påtaglig basal fenotyp. Nurr1-, Tfam- och SNCA-djuren utvecklar en Parkinson-lik fenotyp när de åldras med degeneration av dopaminneuron samt progressiva motorsymptom som i hög grad liknar det mänskliga sjukdomsförloppet. Än så länge har fenotypen av STAT3-linjen inte studerats, men det finns inget som tyder på att dessa möss skulle ha mycket avvikande normaltillstånd eller defekter. Vi har i cellstudier sett att STAT3 är involverat i 5HT1A-receptorsignalering. Vi ämnar göra en beteendemässig utvärdering av denna muslinje för att bestämma den fysiologiska funktionen av 5HT1A-medierad STAT3-signalering. Vi tror att mössen kan uppvisa skillnader i temperaturreglering samt depressivt och ångestliknande beteende. Förhoppningsvis kommer vi att känna till mer om fenotyperna hos de här djuren efter det att dessa studier slutförts. Från vår tidigare erfarenhet , förväntar vi oss inte aggression i avel hanar och några allvarliga symtom i olika KO möss linjer.

Om någon stam uppnår >0.3p i avel så avbryts den och vi kommer in med en tilläggsansökan. Djur från avel kan komma att användas i andra etiska tillstånd. Detta ske efter godkännande av veterinär eller godkänd föreståndare.

Dessa stammar kommer att användas för försök beskrivna under punkt 4

Hållandesätt

- Försöksdjursanläggning
  - [redacted] - Anställd djurpersonal ger djuren daglig tillsyn och har stor vana av att arbeta med transgena djur. Djuren förvaras i vanliga eller ventilerade burar berikade med bomaterial i papper alternativt miljöberikning i enlighet med KI:s beskrivningsplan. Djuren förvaras gruppvis så långt det går men vid specifikt aggressiva djur (riskerar skada djuren) samt avelshanar kan behövas isoleras. Tiden för ensamhållning hålls så kort som möjligt men maximalt 2-3 månader.

N139/16

4 Försökets genomförande

Sammanställning av försöksgrupper och åtgärder inom dessa:

Försöksgrupp: Försöksgrupp 1

Undergrupp: Wild type, Wild type + stress, KO , KO + stress

Djurart: rodents

Åtgärd 1: Beteendetester för att bedöma kognitiva, emotionella och socialt beteende

4.1 Försöksgrupp: Försöksgrupp 1

4.1.1 Undergrupp: Wild type, Wild type + stress, KO , KO + stress

Vi kommer att ha 2 grupper baserat på den genetiska sammansättningen av den individ vildtyp (WT) och KO . Vidare kommer både WT och KO delas upp i två grupper beroende på om de kommer att få stress eller inte under tidig postnatal liv . Så , tillsammans kommer vi att ha fyra Grupper- WT , WT + Stress, KO , KO + stress .

Så småningom kommer djur av alla de fyra grupperna bedömas på domänen av ångest , depression och kognition i vuxen ålder eller ålderdom . Detta kommer att göras för att klargöra effekten av genen och miljön på beteendet. Stress + KO grupp kommer också att ge en inblick i den roll som samspelet mellan gener och miljö på beteende .

rodents, 3000 st, Försöksdjursanläggning

Beskrivning av ras, stam och egenskaper som kan medföra lidande för djuren samt motivering av valet av djur med dessa egenskaper

se beskrivning under punkt 3.1

Genetiskt modifierade djur används: Ja

4.1.1.1 Beskrivning av de åtgärder/ingrepp djuren kommer att utsättas för

Åtgärd 1: Beteendetester för att bedöma kognitiva, emotionella och socialt beteende

Ingående beskrivning av åtgärden

Vad djuret kommer att utsättas för inklusive försöksperiodens längd för det enskilda djuret.

Vi kommer att inducera långvarig stress i en genetisk musmodell för PD eller depression. Beteendetest kommer göras på dessa djur i en för ändamålet utrustad facilitet [redacted] (i fallet med vissa musstammar, skall denna studie utföras på [redacted] såsom anges i bifogat dokument). För att minska det totala användandet av djur kommer vi att använda samma djur i ett nytt test om djuret, efter att ha tillåtits vila under minst en vecka, inte uppvisar några tecken på stress eller ohälsa. Djuren genomgår maximalt 6 olika test, och varje djur genomgår aldrig mer än ett av de båda test där elstötar och vatten används ("passivt undvikande", "porsolt swim test"). De kommer börja med de minst stressande testen ("open field", "sucrose preference", "novel object recognition") och sluta med de test som innebär en större stress ("passivt undvikande", "porsolt swim test"). Djuren hanteras varsamt innan försöket för att vänja djuren vid mänsklig kontakt, minska stressen vid hantering och under försöket.

Begränsat bomaterial-
Ett protokoll för tidig stress i livet ("Early Life Stress", ELS): Modellen baserad på begränsat bomaterial har använts med framgång i ett antal laboratorier över hela världen för att förstå mekanismen för beteende- och neuroendokrina avvikelser pga tidig livsstress. Protokollet för begränsat

bomaterial har också använts med framgång på transgena möss. Syftet med detta protokoll i vår experimentella design är att inducera långvarig stress i en genetisk musmodell för PD eller depression. När honan har fött kommer vi att ha 4 experimentella grupper – vildtypsmöss (WT), tidig livsstress(ELS), "knock-outs" (KO), KO + ELS. Vid P2 sker förändring i buren för alla grupper. För WT och KO grupper kommer lite strö, rör och bomaterial överföras i en ny bur tillsammans med det nya bomaterialet. Bomaterial består av en fyrkantig bit bomullsmaterial som mäter 5 x 5 cm. Detta material är strimlat av modern för att skapa ett bo område. För ELS och ELS + KO används 1/4 av bomaterial jämfört med kontrollgruppen. För ELS och ELS+ stress gruppen placeras bomaterial på en plattform av finmaskigt aluminiumnät på ett lager ca 2,5 cm ovanför burgolvet and burgolvet är täckt med en liten mängd strö (1/10 av standard strö) under gallret för att absorbera urinen. Vi kommer att försöka använda samma typ av metallnät som används av Bram et al. Denna konstruktion gör det möjligt för musspillning att falla under plattformen.
Vid P2 kommer vi att väga modern och notera antal valpar (hanar och honor) före och efter reduceringen av valpar. Antalet ungar per moder kommer att hållas omkring 6 till 8 (samma antal hanar och honor). Burarna kommer att lämnas ostörda från P2 till P9 utom när vi kommer att behöva spela ultraljuds läten (beskrivs senare). Vi kommer dock att kontrollera mödrarnas beteende (för att kontrollera att de inte äter ungarna) utan att störa buren. Vid P9 avslutas ELS-protokollet och djuren (ungar och mamman) överförs till en vanlig bur. Byte av bur kommer också genomföras för de andra två grupperna (WT, KO) som inte följer ELS-protokollet.
Vid P9 kommer ultraljudsläten mätas för alla grupper. Mätningen kommer att ske innan byte av bur. Avvänjning kommer att ske vid P21. Möss från olika kullar inom samma genotyp och grupp kommer att blandas i de olika hemburarna och samma antal djur från varje kull kommer placeras i de olika experimentella betingelserna. Placering av syskon i samma hembur kommer undvikas.
Begränsat bomaterial är en robust modell för att inducera tidig livsstress och fungerar mycket bra i både råttor och möss , inklusive genmodifierade möss , medan protokollet i vilket ungarna separeras från mamman fungerar mycket bra för råttor men inte för alla stammar av möss inklusive C57 BL6. Därför vill vi använda begränsat bomaterialmodellen som utförs av många laboratorier och där ingen risk för kannibalism rapporterats.

Ultrasonic vocalization (USV)-upptagning:
USV från ungar av båda könen, vid "Post Natal Day" (PND) 3, 6, 9, 12 och 15, registreras under en tidsperiod på 5 min. Ungar placeras ovanpå en ren pappersduk i en ren bur. Denna är täckt med akustiskt skum på utsidan och håller en temperatur på 27 ± 1 ° C med hjälp av värmare med infrarött ljus. Ultraljudsläten registreras med hjälp av en kondensatormikrofon som är ansluten till ett automatiserat analyssystem för ultraljud. Burar får 1,5 till 2 timmars acklimatisering till testrummet före start av inspelningar och valpar avlägsnas försiktigt och individuellt endast under inspelningen. Kullkamrater och mammor lämnas ostört i en separat, ventilerad, ljudisolerad bur. Valpar avvänjs därefter, vid P21, och lämnas ostörda till och med 10 veckors ålder då beteendetestning påbörjas. För vissa av våra experiment där vi förväntar oss att se skillnader i åldrande , kommer djuren testas under åldrande. Den maximala ålder då djuren kommer att testas kommer att vara 15 månader.

Lekbeteende:
Lekbeteende är en gemensam aktivitet som observeras i unga individer hos många djurarter. För vårt experiment , kommer lekbeteendet observeras hos fem till sex veckor unga djur vid. För att stimulera lek-bråk ändras hemburarna innan inspelningen. Inspelningen görs i 10 minuter och poäng för beteende sätts offline med hjälp av ett datorprogram. Durationen och frekvensen av följande lek-bråk beteenden kommer bedömas: klämma fast (dvs att hålla nere), "pouncing" (dvs gnugga nacken), slå (eller boxning), bita och sparka. Total tiden med lek-bråk beteende beräknas som summan av den tid som tillbringas i alla dessa beteenden. Vi kommer att göra våra studier av lekbeteende med hembur-kamrater. Eftersom vi inte gör någon manipulation här denna observation inte kommer att påverka djur.

Test av Kulgrävning:
Detta test görs för att bedöma beteenden i form av ångest. Varje mus placeras i en separat propylen bur som är identisk med dess hembur och innehåller 5 cm djup av spån och 24 rena glaskulor jämnt fördelade mot väggen. Ingen mat eller vatten är tillgänglig. Antalet kulor som är begravda till minst två-tredjedelar efter 30 min registreras. För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast

en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen . Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. Kulgrävningstestet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta perioden mellan testerna är 3 månader. Utökat "göm"-beteende indikerar ökat ångest-liknande beteende.

Test av social preferens:
I det sociala preferenstestet (SP) får djuren välja mellan en social stimulans och ett livlöst föremål för att undersöka deras sociala beteende. I vårt fall består den sociala stimulansen av en ung mus (P30 to P38) då de saknar feromoner och kommer därmed inte att framkalla ett aggressivt beteende hos försöksdjuren. De unga mössen, som kommer att användas som en social stimulans, kommer att vänjas vid en trekammar-apparat genom att de placeras var för sig i plexiglascylindern under 10 min i 3 dagar i rad före det sociala testet. Detta kommer att minimera deras stressrespons.

På testdagen placeras den experimentella musen i mellersta kammaren först där den får utforska i 5 min. Dörröppningarna till de två sidokamrarna är stängda under denna tillvänjningsfas. Efter tillvänjningstiden placeras den obekanta juvenila musen (J1) i en av sidokamrarna och föremålet i den andra. Placeringen av J1 och objektet i vänster kontra höger sidokammare motbalanseras. Därefter avlägsnas båda dörrar till sidokamrarna försiktigt och musen tillåts att utforska hela apparaten i en session på 10 min. Sessionen är videoinspelad och durationen av sniffning i respektive cylinder beräknas offline för att utvärdera preferensgraden för den okända J1 jämfört med objektet. Hela anordningen kommer att ha bomaterial under tillvänjningsfasen och under testet. Detta material byts ut mellan försöken. För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen . Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. Social preferens testet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta perioden mellan testerna är 3 månader.

Test av socialt igenkännande:
Dessa studier kommer att utföras i samma apparat som för testet av sociala preferenser. Detta test undersöker djurens preferens för antingen en okänd eller bekant juvenil mus. Detta test görs 30 min efter testet av social preferens. Djuret återinförs till arenan i 5 min och objektet som användes för test av social preferens byts ut mot en annan juvenil mus (J2). Placeringen av den välbekanta juvenila (J1) och obekanta juvenila (J2) motbalanseras för olika djur. De experimentella mössen förväntas utforska okända unga möss mer än välbekanta unga möss.
För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen. Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. Socialt igenkännande testet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta perioden mellan testerna är 3 månader.

Sukrospreferens:
De vuxna djuren ges möjlighet under ett par dygn att dricka ifrån en 0.02% sackarin-lösning bredvid den ordinarie vattenflaskan, således har djuret fri tillgång till både vanligt och sötat dricksvatten. Ett ökat intag av den sötade drycken talar för att djuret ha förmåga att känna välbehag. För detta test , djuren är enda inrymt (för 48-72 timmar) och efter testet , djuren samlats i sitt hem bur . Detta test görs vanligtvis i vårt laboratorium i både manliga och kvinnliga djur (Han och hondjur) , och vi ser inte någon skadlig effekt av enda hölje på djur när de samlats i hemmaburen. Detta test kommer att utföras i djur på mer än 10 veckors ålder . Den maximala ålder då detta test kommer att utföras på djur när de inte kommer att vara mer än 15 månader.

Olfactory discrimination test: I detta test placeras ett träblock (ca 2cm3) I djurens hembur under en tid så att träblocket kan absorbera djurens doft. Blocken avlägsnas sedan från buren och placeras tillsammans med lite bäddmaterial i en märkt plastpåse eller i ett provrör. Under försöket placeras

musen i en bur tillsammans med ett block från dess egen hembur samt ett block från en annan bur (tillhörandes möss av samma kön). Tiden som musen spenderar undersökandes/sniffandes respektive block mäts, och ger en indikation på musens förmåga att särskilja dofter. I ett annat test som mäter djurens förmåga att särskilja
dofter placeras musen i en bur med två täckta skålar varav den ena innehåller en doft (ex. vanilj, citron, kanel) och den andra innehåller vatten. Koncentrationen av doftolja/krydda i den doftande lösningen kan varieras för att testa hur känsligt djurets luktsinne är. Tiden djuret spenderar undersökandes respektive doft mäts, och ger en indikation på djurets förmåga att känna dofter. Innan testest kommer mössen fastas i upp till 6h för att öka motivationen att undersöka dofter.

Open-field, lokomotionstest:
Datoriserad testmodell som omfattar mätning av rörelseaktivitet. Djuren placeras i en mätbur eller "open-field" arena (ca 50*50 cm). Djuren får fritt explorera buren/arenan under en period upp till 60 minuter. I vissa typer av försök mäts djurens spontanaktivitet utan påverkan från någon substans, den s.k. habitueringsfasen. Efter habitueringsfasen placeras djuren åter i sin hembur, och får sedan genomgå ytterligare ett lokomotionstest som jämförs med habitueringstestet. För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen. Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. Open-field testet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta perioden mellan testerna är 3 månader.

Novel object recognition (NOR):
I detta test mäts förmågan att minnas föremål. Denna typ av minne medieras främst via perirhinal cortex, men även till viss del via hippocampus beroende på hur stark omgivningens inverkan är. NOR kräver varken positiv eller negativ förstärkning då testet baseras på gnagares naturliga beteende att närma sig och undersöka främmande föremål. Detta är relevant då genmodifierade eller drogbehandlade djur testas, eftersom att dessa djur kan svara avvikande på straff och belöning. NOR består av tre faser. Under den första fasen, habitueringsfasen, får djuren utforska en tom öppen arena (46*46 cm) utan objekt, för vänja djuren vid arenan och minska den stress som åsamkas djuren då de exponeras för en okänd miljö under de följande faserna. Träningsfasen sker följande dag, varvid djuren åter placeras i den öppna arenan, denna gång i närvaro av två identiska föremål. Efter ett tidsintervall (15min-24h), som djuret spenderar i en tillfällig bur (eller i sin hembur, om testfasen utförs dagen därpå), placeras djuret åter i den öppna arenan för försökets tredje fas; testfasen. I testfasen har ett av de identiska föremålen bytts ut mot ett nytt föremål, som skiljer sig form- och färgmässigt mot det tidigare föremålet, och som djuret inte är bekant med sedan tidigare. Skillnaden i tid spenderandes att undersöka det nya respektive det bekanta föremålet ger en indikation på graden av igenkänning av det bekanta föremålet, och kan därmed användas som ett test för minnesfunktioner. För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen. Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. NOR testet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta perioden mellan testerna är 3 månader.

Light/dark box:
Detta test mäter ångest-liknande beteenden i råttor och möss utan att djuren behöver tränas. Testet baseras på gnagares naturliga benägenhet att undvika öppna och upplysta ytor. Djuren placeras i en arena med två rum, ett med vita väggar utan tak, och ett som har svarta väggar och tak. Spenderar djuren mycket tid i det mörka rummet tolkas detta som ängsligt beteende medan tid i det vita rummet tolkas som avsaknad av ängslighet. Testet utförs under en period på 5-15 minuter. För de flesta av experimenten kommer djuren exponeras endast en gång till detta beteende test. För experiment där djur kommer att behandlas med antidepressiva substanser, kommer detta beteende att ske två gånger – en gång före behandlingen och en gång efter behandlingen. Detta görs för att kontrollera effekten av den antidepressiva substansen. Det kommer att gå minst 4 veckor mellan första och andra testet. Light/dark box testet kan även utföras två gånger vid studier av åldrande då det görs vid olika ålder och minsta

perioden mellan testerna är 3 månader.

Mätning av Stressinducerad hypertermi (SIH):
Kroppstemperatur påverkas av två olika serotoninreceptorer (5HT1A och 5HT7). Vi avser att studera hur olika ligander till dessa receptorer påverkar kroppstemperatur och om eventuella effekter är medierade genom specifika gener. Vi har nyligen observerat att serotoninreceptorernas funktion regleras av proteinerna S100B och STAT3. Vi ämnar därför i vissa studier att undersöka hur kroppstemperaturen påverkas med hjälp av rektaltermometer.
Protokollet av stressinducerad hypertermi (SIH) innebär mätning av rektal temperatur (T1) som representerar vilande temperaturen . Efter den första mätningen , T1, är varje mus placeras i en ny liten bur med ett enda hölje. Den andra mätningen av rektal temperatur tas 10-15 minuter efter den första mätningen. Djuren blir stressade av den första mätningen och uppvisar i allmänhet en högre temperatur vid andra mätningen. Efter sista mätningen, sätts djuren tillbaka till sin hembur.
Mer oroliga djur kommer att uppvisa högre delta T (T2 - T1) än mindre oroliga djur .
Detta protokoll kan användas för att testa den anxiolytiska effekten av ett läkemedel. Beroende på farmakokinetiken hos läkemedlet, kan läkemedlet injiceras 60 minuter innan mätning av den basala temperatur (om ett läkemedel har långsam kinetik) eller omedelbart efter att ha tagit den basala temperatur (om ett läkemedel har snabb kinetik). De doser vi använder vid administration av substanser är i enlighet med våra och andras tidigare studier..
Eftersom parametern mättes för ångest i stressinducerad hypertermi är inte beroende av rörelseaktivitet, som i nästan alla andra ångesttest, är stressinducerad hypertermi ett pålitligt test för mätning av ångestnivå. SIH har en utmärkt prediktiv validitet och olika läkemedel har visats reducera SIH respons på ett dosberoende sätt. Möss kommer att hållas tillbaka av försöksledaren för mätning av rektal temperatur. Det är viktigt att använda en termometer med en slät spets för att undvika inre blödningar. Spetsen på termometern bör smörjas innan du sätter i rectus av djur så att det är inte smärtsamt för djur.

Passivt undvikande (PA):
I detta test har hippocampus en viktig funktion. Detta innebär att testet påvisar förändringar i delar av hjärnan som hos människor är viktiga för rums uppfattning, och där funktionsnedsättningar visats hos deprimerade patienter. Djuren tränas i en experimentbur som är uppdelad i två halvor varav den ena är ljus och den andra mörk. I den första omgången får djuret fritt utforska buren under 2 minuter utan att exponeras för någon ström. Vid själva inlärningstestet, som endast sker vid ett tillfälle, placeras djuret i den ljusa delen. Efter 1 minut öppnas dörren till den mörka halvan automatiskt och djuret får självmant gå över. Väl där presenteras en svag och kortvarig ström (0.1-0.5 mA, 1-2s duration) i burgolvet. amplituden hos strömmen förväntas inte producera någon svår smärta.
Vid dessa låga strömstyrkor upplever djuren ett lätt obehag som yttrar sig i att djuret lyfter tassarna från golvet. 30s efter strömexponeringen tas djuret upp ur buren och placeras i en annan bur, för att sedan placeras i sin hembur. Det finns inga tecken på kort- eller långtidseffekter av denna kortvariga strömexponering, exempelvis förändras inte födointaget eller kroppsvikten hos dessa djur. Djuren kommer att hållas någon gång i en annan bur innan det blir överfördes i hemburen för att minimera stress överföring till hem burkamrater.
Minnet testas utan strömexponering antingen senare samma dag eller upp till en vecka efter träningen, beroende på om kort- eller långtidsminne undersöks. Vid detta tillfälle placeras djuret återigen i den ljusa delen av buren och dörren till den mörka delen öppnas efter 10s. Den s.k. latenstiden mäts, d.v.s. den tid det tar för djuren att gå från den vita till den svarta delen, vilken utgör ett mått på minnet. Om inte djuret har gått över inom 5 minuter tas djuret upp och placeras i sin hembur. Om de däremot går över innan 5 minuter har passerat, tas de upp ur buren när de väl gått över till den mörka delen. Den maximala tiden som djuren spenderar i buren vid minnestestet är alltså 5 minuter.

Tail Suspension Test:
"Tail suspension test" har visat sig vara ett djurexperiment som till hög grad kan förutsäga om behandlingen har en antidepressiv effekt även hos människor. Gnagare tenderar att minska sin ansträngning för att komma ur en situation om denna inte går att undkomma. I jämförelse med simtestet får möss istället hänga fritt i luften, genom att svansen fästs vid en horisontell stång med hjälp av tejp .Vi kommer att ha en mjuk trasa nedan om bandet glider och mus faller ned men baserat på våra erfarenheter sker inte detta.
Tiden då musen inte längre försöker att klättra upp mäts sedan under 6 minuter. Liksom i Porsolt Swim

Test indikerar en lägre grad av mobilitet depressionslikt beteende, och graden av mobilitet ökar om mössen får antidepressiva farmaka. Detta test kommer att utföras endast en gång för alla experiment och kommer att vara det sista försöket av studien innan djuren avlivas. Om totalt 800 möss kommer att genomgå detta test i 5 år.

Porsolt Swim Test:
Detta test är en modell för inlärd hjälplöshet och används för att studera "antidepressiva" effekter hos gnagare. Djuren placeras en åt gången i en glascylinder (höjd 25cm, diameter: 13cm) som innehåller vatten upp till 16cm, detta för att djuren inte skall kunna stå på botten med hjälp av sina bakben. Temperaturen på vattnet är 24 till 25 grader celcius. Detta test utförs för vanligtvis 5-6 minuter i möss. Om totalt 800-900 möss kommer att genomgå detta test i 5 år. Djurets mobilitet detekteras d.v.s. den tid som djuren flyter passivt i vattnet utan att utföra mer rörelser än de som är nödvändiga för att hålla nosen ovanför vattenytan. Under dessa betingelser har djuren inga problem att med simrörelser stanna kvar ovanför vattenytan. En lägre grad av mobilitet i detta test indikerar depressionslikt beteende, och graden av mobilitet ökar om mössen får antidepressiva farmaka. Detta test kommer att utföras endast en gång för alla experiment och kommer att vara det sista försöket av studien innan djuren avlivas.

Funktionell utvärdering av hypotalamus-hypofys-binjure (HPA) axelns funktion:
För att undersöka samspelet mellan genotyp, stress och HPA-aktivitet i etiologin av depression och ångestsyndrom kommer vi utföra en separat uppsättning experiment för att funktionellt utvärdera HPA-axelns funktion. Detta kommer att ske genom att antingen analysera blodprov från djuren som avlivats omedelbart efter Porsolt swim test (se ovan), eller genom att inducera frisättning av adrenokortikotropiskt hormon (ACTH) genom en intraperitoneal injektion av kortikotropinfrisättande hormon (CRH), substanser som påverkar CRH receptorer eller dexametason (syntetisk kortikosteron), följt av eutanasi vid olika tidpunkter, för att utvärdera skillnader i produktionen av ACTH och kortikosteron samt
feedback-inhibition som svar på dessa behandlingar. Dosen av den injektion av dessa beredningar avsedda kommer att vara i enlighet med litteraturenp.);max. volym 20ml/kg se
"Farmakologisk behandling för detaljer".

Tallium behandling för mätning av nervaktivitet:
Neuronal aktivitet är tätt kopplad till kaliumupptag . Därför injicera möss med Tatllium som är en analog till kalium är en bekväm metod för kartläggning neuronal aktivitet . Möss injiceras med 200 | il av en 2% vattenlösning av tallium acetat eller tallium diethyldithocarbamate trihydrat (TIDDC). Den TIDDC Lösningen görs genom att blanda lika volymer av TlAc- lösningar och natrium diethyldithocarbamate trihydrat (NaDDC) lösningar. Den slutliga koncentrationen av lösningen är 0,75% TIDDC i 0,9% NaCl. Först göra en vattenlösning av 1% TlAc. Sedan en lika stor volym av 1% NaDDC löst i 1,8% NaCl (Observera att de lipofila kelat komplexa former så snart TIAC och NaDDC blandas). Därför är det viktigt att använda nålen med lämplig mätare. Möss injiceras intraperitonealt (i.p.) med 250 pl av denna lösning framställs (från 125 ul av 1% TlAc lösning and125 ul av 1% NaDDC lösning). Enligt publicerade studier, är bättre för detektering jämfört med tallium acetat TIDDC. Vi kommer att försöka båda föreningarna i vår pilotstudie och se vilken som fungerar bättre för oss. Enligt publicerade artiklar, är inte skadligt för djur injektion av tallium i ovannämnda procentandelen och inga biverkningar har rapporterats. Ändå kommer vi kontrollera detta i vår pilotstudie. Antalet djur som används för pilotstudier kommer att vara 8 till 10. Möss kommer att perfusion 30 min posta tallium injektion. Perfusion lösning innehåller 0,325% Na2S i 100mMphosphate-buffert, pH 7,4 (10 ml Na2S stamlösning i 200 ml PB). Enligt offentliggjorda resultat, detta protokoll öka känsligheten med avseende på tallium. Efter perfusionen, är hjärnor skördas. Hjärnor är senare behandlas för autoradiografi, som gör det möjligt att titta på den hjärnregion
specifik aktivitet.

Farmakologisk behandling:
De vuxna djur som genomgår beteendetest kommer i vissa fall erhålla farmaka i födan eller via injektioner (ca 800 till 1.000 djur i 5 år). Doser av injektion varierar beroende på ämnet , men bygger på tidigare erfarenheter från vårt och andras labb. Djuren kommer att injiceras intraperitonealt (20 ml/kg) antingen akut eller kroniskt (en injektion
dagligen under en-tre veckor). Om vi ser någon uppenbar lidande hos djur som ett resultat av upprepad

i.p. injektion, kommer buken palperas för tecken på peritonit med farmaka som påverkar monoaminerg och/eller glutamaterg neurotransmission samt dess modulerande substanser (tex reserpine, skopolamine, fluoxetine, citalopram, tianeptine, L-DOPA, SD2002, SD2003, SRA-880, selektiva serotoninreceptor ligander (tex 8-OHDPAT, NAD190, CP94254, NAS181, RS67333), selektiva dopaminligander (tex ropinirol, bromokriptin), selektiva glutamatreceptorligander (tex. Ro 25-6981, MK801, ketamin), samt cannabinoidreceptor-ligander (tex cannabidiol, delta-9 tetrahydrocannabinol, WIN55,212-2, SR141716A, AM251) och substanser som modulerar det cannabinoida systemet (tex DAG lipase-inhibitorn RHC80267 och FAAH-inhibitorn URB937). Då vi även är intresserade av att studera cellproliferering samt neurogenes så kommer vissa djur att injiceras intraperitonealt (20 ml/kg) med tex thymidinanalogen BrdU vid maximalt 4 tillfällen.

Påltest:
Musen placeras på toppen av en vertikal påle som är 50-55 cm hög och 0,8-1 cm bred och har en sträv yta. Tiden från det att musen placerats vid pålens topp med huvudet upp tills det att den vänt sig om och klättrat ner på marken mäts, vilket ger en indikation på musens motoriska förmåga. Detta test är mycket känsligt för nigrostriatal dysfunktion som är relevant för studier av Parkinsons sjukdom. Detta utförs maximalt fem gånger under högst är 120 sekunder per mus. Detta test har mycket liten negativ effekt på möss eftersom det är en riktigt snabbt test. Stolpen placeras i standard möss bur så att när djur sjunka tillbaka de kommer tillbaka i buren. Detta görs för att säkerställa att det inte finns någon skada i det fall djuret faller ned under provningen Bjälktest:
I detta test tränas musen att gå över en 1-2m lång bjälke som leder till musens hembur. Tiden det tar för musen att gå över bjälken till hemburen samt antalet snedsteg mäts, vilket ger en indikation på djurets motoriska förmåga och koordination. Detta test är känsligt för dysfunktion i basala ganglierna som är relevant för studier av Parkinsons sjukdom. Detta utförs maximalt fem gånger under högst är 120 sekunder per mus. Detta test har mycket liten negativ effekt på möss eftersom det är en riktigt snabbt test. Experimentet kommer att ske i deras hemburar. Möss aldrig falla ner på grundval av vår tidigare erfarenhet.

6-OHDA-lesionering:
För studier av Parkinsons sjukdom så kommer 6-OHDA modellen att användas. På senare år har 6-OHDA-modellen börjat utföras även på möss med modifieringen att 6-OHDA injektionen sker i striatum, mediala framhjärnansbunten eller substantia nigra. Vi avser att använda denna procedur på vuxna (3-6 månader) möss (C57BI6) genom en stereotaktisk operation. Denna operation sker på en för ändamålet utrustad dragbänk och under sterila förhållanden, där det sövda (Ketamin/Xylazin 100/10 mg/kg, intraperitonealt 0.1 ml/10 g kroppsvikt, alternativt används en blanding av isofluran med luft som narkosmedel och doseras med hjälp av en narkospump, eller annat likvärdigt narkosmedel rekommenderat av veterinär; ögongel används för att undvika uttorkning av ögon) djuret injiceras lokalt med 6-OHDA. Denna injektion kommer att föregås av att ett litet hål borras i skallbenet och injektionen kommer att ske med en hastighet på 0.5µl/min. Sammanlagt kommer 3 µl att injiceras med en Hamiltonspruta. Djuret får behandling med lokalanestetika (Lidokain) i sårkanterna och på benhinnan vid skallbenet. Som smärtlindring ges buprenorfin (Temgesic: 0,1mg/kg, s.c.) i samband med operationens start för att uppnå fullgod effekt innan uppvaknande, samt postoperativt 2 gånger under 24 timmar efter operationen och därefter vid behöv. Baserat på vår tidigare erfarenhet , förväntar vi oss inte några tecken på smärta som en följd av resultatet av kirurgi.Proceduren tar ungefär 30 min. Anestesidjupet kontrolleras genom att djurets tass nypes. Djuret bedöms vara tillräckligt sövt då det ej reagerar på dessa stimuli. Andning och kroppstemperatur hålls normal med hjälp av en automatiserad värmedyna. För att hålla ögonen fuktiga under operationen ges viskös tårersättning (exempelvis Oculentum simplex). Djuret hålls under uppsikt i uppvärmingsbox eller under värmelampa tills det vaknar och får därefter daglig tillsyn. Vid operationen uppstår sällan komplikationer, men om så skulle vara fallet så avlivas djuret omedelbart genom cervikal dislokation. Eftersom 6-OHDA injiceras i en hjärnhemisfär så kommer djuret att utveckla en viss sidoskillnad i sin rörelse- och kroppshållning. Då dessa symtom uppkommer (ungefär efter en vecka) så kommer avbrytningpunkten att ändras till >0.7 enligt KI's bedömningsmall (varav 0.4 kommer att stå för rörelse och kroppshållning. Typiskt , djuren göra mindre rörelse och inte uppvisar stretching beteende för en vecka efter lession . Maten serveras i en halvfast form inne i buren för en vecka eller så tills de återhämta sig från operationen . Dock kommer avbrytningspunkten att fortsätta vara >0.3 enligt KI's bedömningsmall om djuren utvecklar symptom förutom de motoriska förändringarna. Därmed, om något av djuren uppenbarligen skulle lida

utöver det som nämnts ovan så kommer djurförsöket att avbrytas innan den planerade slutpunkten uppnåtts, inklusive om djuren utvecklar komplikationer postoperativt (>0.3). Djuren kommer att vägas minst 2 ggr/vecka. Mössen får stödfoder och vatten på burgolvet ett par veckor efter ingreppet. För att undvika viktminskning och för att upprätthålla välfärden för de djur som genomgår kirurgi , de får halvfast mat som är lättare för dem att äta .

Rotationstest: Tre veckor efter 6-OHDA behandlingen injiceras apomorfin/L-DOPA/benserazide (1/5-50/2,5-25 mg/kg, intraperitonealt 0.1 ml/10 g kroppsvikt) och uppvisar, i de fall som 6-OHDA injektionen orsakat degeneration av dopaminneuron, ett karakteristiskt rotationsbeteende som varar i ungefär 30 min. 6 - OHDA lession möss kommer också genomgå påltest och bjälktest (som beskrivits ovan) bortsett från rotationstest.

Om vi observerar skillnader i första omgången av beteendetester kan flera alternativa vägar väljas.

Linje diagram av försöken är fästa i fästdelen av licensen. Såsom visas i linjediagrammet varje djur kommer att vara utsatt för maximal 6 beteende testet med en uttvättningsperiod mellan två beteendetester. Få studier kommer att ske hos vuxna djur (3-5 månader), få kommer att ske i äldre djur (10-15 månader).

Beskrivning av hur djuret kommer att påverkas av åtgärden – eventuellt fysiskt och psykiskt lidande

Eftersom läkemedel som administreras till människor, exempelvis L-DOPA och fluoxetin vilka är antidepressiva eller stimulerande, kommer att användas i dessa studier så bedöms de flesta försöken att vara av ringa svårighetsgrad och avbrytningspunkten 0.3 enligt Kls bedömningsmall. Det finns inga förväntade konsekvenser av tallium injektion, förutsätt att den som utför försöken administrerar lösningen ganska långsamt och därmed undviker abdominala spasmer. Djuren avlivades 30 minuter efter tallium injektionen och därför förväntas inga andra fysiologiska konsekvenser innan den experimentella slutpunkten.
Vi anser även att alla beteendetest i sig är av ringa svårighetsgrad, utom "Porsolt swim test", "tail suspension test" och "passivt undvikande" som anses vara av avsevärd svårhetsgraden. Varje mus kommer genomgå max 6 beteendetest med en veckas vila mellan testen för att minimera stressen. Inför beteendetesten kommer djuren att hanteras för att vänja sig vid personen som utför experimenten för att minimera stressen vid hantering och eventuell injektion. Pga. att de djur som beteendetestas ofta kommer utsättas för flera procedurer (beteendetest, läkemedelsadministrering) av ringa svårighet bedöms dessa försök vara av måttlig svårighetsgrad.

I vissa studier kommer vi använda djurmodeller för Parkinsons sjukdom och dessa bedöms vara av måttlig svårighetsgrad. Syftet med att använda djurmodeller för Parkinsons sjukdom, i detta fall 6-OHDA, är att de skall efterlikna de symptom som man ser hos människa. Dessa neurodegenerativa sjukdomar, samt dess djurmodeller, är ju förenade med gradvis inträdande av motoriska beteendeförändringar. Efter 6-OHDA-behandling kan mössen börja uppvisa motoriska förändringar och något inskränkt rörelseförmåga. Mössen får postoperativ vård dagarna efter injektionen (smärtlindring, stödfoder).
Den förväntade svårhetsgraden är alltså måttlig, utom för de djur som genomgår "begränsat bomaterial, Porsolt swim test/passivt undvikande", där svårighetsnivån är avsevärd.

Motivering av åtgärden – varför den behöver göras och varför beskrivet sätt är det bästa sättet att utföra åtgärden på

Alla valda tester är standardtester vid studier av dessa sjukdomar. De presenterar en god prediktiv, nominell och konstruktiv validitet. Anledningen att välja olika tester som analyserar ett specifik beteende (t.ex. "open field test" och "light-dark box" för ångest) är att dessa tester är känsliga för specifika klasser av läkemedel, men inte för alla. Därför behöver vi olika tester, eftersom vi utvärderar 6 olika läkemedelsklasser

Beskrivning av vad som ska göras för att minska djurets lidande – både farmakologisk lindring och övriga insatser liksom ökad tillsyn

Ansvarig person ska regelbundet kontrollera djurens vikt och observera deras fysiska tillstånd under experimenten. Eftersom forskningen strävar efter att efterlikna behandlingar som ges till människor så kommer låga-måttliga doser av farmaka att användas. Vi strävar efter att utöka administreringen av farmakan i födan istället för med injektioner, särskilt för att kunna undvika injektioner under flera dagar. I den mån det är möjligt kommer injektionsplatsen att variera något mellan dagarna för att eventuell lokal irritation skall minska utan att substansen skall injiceras på felaktig plats. Vid upprepade injektioner i samma djur så kommer buken att palperas eller nackhuden att undersökas innan varje ny injektion så att inga förhårdnader eller andra problem uppstått pga tidigare injektioner. Vid tveksamheter avbryts behandlingen av djuret eller så tillkallas veterinär för att avgöra graden av djurets evetuella lidande. De flesta av substanserna ges även till patienter. När så ej är fallet har de uppvisat stimulerande/antidepressiva effekter hos försöksdjur, utan att ha dokumenterats ge upphov till signifikanta besvär som lokalt irriterande effekter, påverkan av födo/vätskeintag eller annan typ av avsevärd komplikation.
Djuren som får 6-OHDA lesioner kommer att erhålla lokalbedövning med lidokain i sårkantema och på benhinnan vid skallbenet. Som smärtlindring ges buprenorfin (Temgesic, 0,3mg/ml, s.c.) i samband med operationens start för att uppnå fullgod effekt innan uppvaknande, samt postoperativt 2 gånger under 24 timmar efter operationen och därefter vid behöv. Anestesi uppnås med ketamin/xylazin 100/10 mg/kg, intraperitonealt 0.1 m/10g kroppsvikt, eller med isofluran. Om annat medel rekommenderas av veterinär kommer detta att användas istället. Djuren får postoperativ vård dagarna efter injektionen (smärtlindring, stödfoder).

4.1.1.2 Svårhetsgrad och avbrytningspunkt

Svårhetsgrad: Avsevärd

Beskrivning av avbrytningspunkten

Eftersom farmaka som administreras till människor, exempelvis L-DOPA och fluoxetin som är antidepressiva eller stimulerande, kommer att användas i dessa studier så bedöms de flesta försöken i sig att vara av ringa svårighetsgrad och avbrytningspunkten 0.3 enligt Kls försökdjursråds bedömningsmall.
Alla beteendeförsök anses i sig att vara av ringa svårighetsgrad, utom "begränsat bomaterial", "Porsolt swim test" och "passivt undvikande", som anses vara av avsevärd svårighetsgrad.
I de fall då djur genomgår upprepade beteendetest (max 6st/djur) samt administreras läkemedel (dvs. flera procedurer av ringa svårighetsgrad) bedöms försöken vara av måttlig svårighetsgrad, utom för de djur som genomgår "Porsolt swim test/passivt undvikande", där svårighetsgraden är avsevärd. Vissa studier kommer att använda djurmodeller för Parkinsons sjukdom och dessa bedöms vara av måttlig svårighetsgrad. Syftet med djurmodeller för Parkinsons sjukdom, i detta fall 6-OHDA, är att de skall efterlikna symtomatologin som man ser hos människor. Dessa neurodegenerativa sjukdomar, samt dess djurmodeller, är ju förenade med gradvis inträdande av motoriska beteendeförändringar.
Vid studier av Parkinsons sjukdom kommer dock vissa djur att användas i längre försök då de har progressiva beteendesymtom eller får farmakologisk behandling enligt ovan, och dessa studier kan vara upp till 6 veckor. Denna grupp av djur är nödvändiga att studera eftersom de ger viktig information om sjukdomsprogressen vid Parkinsons sjukdom. Dessa djur kräver ingen särskild skötsel, de äter och dricker normalt, men de har ibland inskränkt rörelseförmåga, nedsatt libido och förmodligen depressionsliknande symtom. Om något av djuren uppenbarligen skulle lida utöver det som nämnts ovan (ex- viktminskning mer än 15%) så kommer djurförsöket att avbrytas innan den planerade slutpunkten uppnåtts. Avbrytningspunkten för djur som genomgått 6-OHDA-lesionering kommer att vara >0.7 enligt KIs försökdjursråds utökade bedömningsmall (varav 0.4 kommer att stå för rörelse- och kroppshållning). Typiskt , djur göra mindre rörelse och inte uppvisar sträcker behior en vecka efter lession . Mat ges i en halvfast tillstånd för dem inne i buren , så att de inte behöver sträcka för att nå ut för livsmedel . Dock kommer avbrytningspunkten att vara >0.3 enligt KIs försökdjursråds bedömningsmall om djuren utvecklar symptom förutom de förväntade motoriska föränd ringarna. Därmed kommer djuren att avlivas om de skulle utveckla symptom postoperativt eller efter någon enstaka injektion. Även dessa försök bedöms vara av måttlig svårighetsgrad.

4.1.1.3 Efter försöket

Avlivningsmetod: Dekapitering

Om metoden inte gäller alla djur ska de djur anges som ska avlivas på detta sätt.

Denna metod för avlivning kommer att antas för experiment där trunk blod krävs för att bedöma graden av kortikosteron hos djur och för experiment där hjärnor från djuren ska användas för genuttryck studie. Djuret kommer att placeras i en decapicone före kapning huvudet. Djuren kommer inte bedövas innan halshuggning eftersom målet kommer att samla stammen blod för kortikosteron analys och anesthetizing dem kan förväxla vår kortikosteron läsa outs. Dessutom kommer unga möss som föds och under 10 dagars ålder skall avlivas genom " dekapitering " utan anaestheisa .

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Destruktion av hjärnan
- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Död bekräftas av metoden för decapitating och avlägsnande av hjärnan

N139/16

Avlivningsmetod: Koldioxid

Om metoden inte gäller alla djur ska de djur anges som ska avlivas på detta sätt.

Denna metod för avlivning kommer att antas när djurtekniker behöver avsluta stort antal kohorter på grund av orsaker som fel genotyp .

Bedövningsmetod

Narkosmedel

Beskrivning av bedövningsmetoden

en automatiserad koldioxid mättnads bur kammaren ska användas

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Destruktion av hjärnan
- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Kontroll att nacken är bruten smat att djuret inte andas eller uppvisar andra livstecken

Avlivningsmetod: Injektion av kemiska preparat på medvetslösa djur

Om metoden inte gäller alla djur ska de djur anges som ska avlivas på detta sätt.

Djuren injicerades intraperitonealt (i.p.) med 100/10 mg / kg ketamin xylazin . Volymen av injektion är 0,1 ml / 10 g . Denna metod kommer att användas innan perfusion djuren med 4 % PFA eller 0325 % Na2S i 100mMphosphate - buffert . Det är viktigt att utföra transcardial perfusion för experiment där hjärnor från djuren ska användas för immunohistokemi eller autoradiografi

Bedövningsmetod

Narkosmedel

Beskrivning av bedövningsmetoden

Djuren injicerades intraperitonealt (i.p.) med 100/10 mg / kg ketamin xylazin . Volymen av injektion är 0,1 ml / 10 g .

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Destruktion av hjärnan
- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Döden kommer att bekräftas genom att kontrollera blodcirkulationen har stoppats och avlägsnande av hjärnan hos individen.

Djuren kommer att återanvändas i andra försök som inte omfattas av denna ansökan

Beskrivning av vad djuren kommer att användas till efter försöket har avslutats.

Djur under detta tillstånd kan komma att återanvändas efter godkännande från veterinär till andra etiska tillstånd, t.ex. avelsdjur eller djur som genomgått försök av ringa eller måttlig svårhetsgrad. Djur som ska användas för live-imaging transporteras från [redacted] till lämplig avdelning via för möss godkända transportmedel och efter veterinärgodkännande.

N139/16

5 Undantag, sammanfattning

N139/16

Populärvetenskaplig sammanfattning

Titel

Undersökning av tidig livsstress i genetiska gnagarmodeller för depression / neurodegenerativ sjukdom

Sökord

Depression, ångest, parkinsons sjukdom, påfrestning, socialt beteende

Varaktighet

Försöket beräknas pågå till 2021-08-23

Använda djurarter

- rodents, 3000 st

Syfte med försöket

☑ 1 Grundforskning

☑ 2 Forskning om vilka effekter sjukdomar, ohälsa eller annat avvikande tillstånd har på människor, djur eller växter samt hur de ska undvikas, förebyggas, diagnosticeras eller behandlas

☐ 3 Forskning som innebär utvärdering, påvisande, reglering eller modifiering av fysiologiska tillstånd hos människor, djur eller växter

☐ 4 Forskning som syftar till förbättring av djurens välfärd

☐ 5 Utveckling, tillverkning eller testning av kvalitet, effekt och säkerhet av läkemedel, livsmedel, foder och andra ämnen eller produkter; detta gäller endast i de syften som avses i 2-4

☐ 6 Forskning som syftar till artskydd

☐ 7 Skydd av den naturliga miljön för att bevara människors eller djurs hälsa eller välfärd

☐ 8 Rättsmedicinska undersökningar

☐ 9 Användning i högskoleutbildning eller i utbildning som syftar till att förvärva, upprätthålla eller utveckla yrkesfärdigheter under förutsättning att användningen framgår av utbildningens kursplaner, och är nödvändig med hänsyn till syftet med utbildningen.

☐ 10 Upprätthållande av kolonier av genetiskt förändrade djur som inte används i andra försök

☐ 11 Annat - gäller endast för försök som sannolikt inte orsakar lidande i lika stor eller större utsträckning än ett nålstick som utförts enligt god veterinärmedicinsk praxis

N139/16

Beskrivning av syftet med försöket

Beskrivning av vad forskaren syftar till att uppnå, ta reda på, fastställa eller framställa genom att utföra detta försök.

Depression är en vanlig psykisk störning och är den vanligaste orsaken till funktionsnedsättning i världen. Omkring 350 miljoner människor i alla åldrar lider av depression. En av de mest accepterade teorierna bygger på att depression triggas av tidiga motgångar i livet. Depression orsakas vanligtvis av en interaktion mellan miljöfaktorer och en underliggande genetisk komponent. En ökande mängd evidens indikerar att negativa händelser under barndomen är förknippade med ökad risk för utveckling av psykiska störningar i vuxen ålder. För att försöka förstå neurobiologin bakom depression har djurmodeller återspeglande tidig livsstress utvecklats i primater och gnagare. Länken mellan tidig stress i livet och affektiva störningar är också relevant för neurodegenerativa sjukdomar eftersom de flesta patienterna med neurodegenerativa sjukdomar uppvisar emotionella och kognitiva brister. Studier som syftar till att belysa tidig stress i livet och dess roll i uppkomst och utvecklingen av neurodegenerativa sjukdomar som Parkinsons sjukdom (PD) har visat att tidig livsstress i form av separation från modern gör att dopaminerga neuroner lättare degenererar vid exponering för giftiga medel som inducerar PD. Effekten av stress tidigt i livet har inte studerats i djurgenetiska modeller för neurodegenerativa sjukdomar.
Detta projekt kommer fokusera på att undersöka emotionella, sociala och kognitiva beteenden i genetiska mus och råttmodeller för depression eller neurodegenerativa sjukdomar. Vi förväntar oss att tidig livsstress kommer att öka känslomässiga, sociala, kognitiva, motoriska brister i våra transgena djur. Beroende på vilket beteende som fås kommer vi eventuellt använda en lämplig antidepressiv i efterförloppett av exponeringen för stressen. Denna studie kommer att belysa betydelsen av interaktionen mellan arv och miljö vid psykiatriska symptom hos relevanta transgena djur. Vi strävar också efter att hitta en lämplig substans som skulle kunna förhindra uppkomsten av psykiatriska symptom i genetiska gnagarmodeller för neurodegenerativa sjukdomar.

Beskrivning av nyttan av försöket

Beskrivning av nyttan för människa, djur eller miljö. Hur resultaten väntas få betydelse för den medicinska eller biologiska utvecklingen och när det gäller grundforskning vilka framsteg eller nya rön som kan förväntas på längre sikt.

Vi förväntar oss att resultaten kommer att bidra till karakterisering av nya och potentiellt viktiga patologiska mekanismer bakom depressionsrelaterade tillstånd som kanske kan leda till nya rön för behandling. Försöken förväntas också ge insikt i hur miljömässiga och genetiska faktorer samverkar med neurodegenerativa faktorer för att orsaka egentlig depression.

N139/16

Beskrivning av vilken påverkan försöket förväntas ha på djuren

Beskrivning av vilka negativa effekter försöket förväntas ha på djuren och vad som ska hända med djuren efter försöket.

Eftersom läkemedel som administreras till människor, exempelvis L-DOPA och fluoxetin vilka är antidepressiva eller stimulerande, kommer att användas i dessa studier så bedöms de flesta försöken att vara av ringa svårighetsgrad och avbrytningspunkten 0.3 enligt Kls försökdjursråds bedömningsmall. Protokollet för "begränsat bomaterial" kommer generera en stressrespons i musungar genom att påverka interaktionen med mamman. Evidens från tidigare studier som använt detta protokoll indikerade att det inte ledde till någon skillnad i mortalitet eller långsiktiga förändringar i vikt pga detta protokoll.
Vi anser även att alla beteendetest i sig är av ringa svårighetsgrad, utom "Porsolt swim test" och "passivt undvikande" som anses vara av avsevärd svårighetsgrad. Varje mus kommer genomgå max 6 beteendetest med en veckas vila mellan testen för att minimera stressen. Inför beteendetest kommer djuren att hanteras för att vänja sig vid personen som utför experimenten för att minimera stressen vid hantering och eventuell injektion. Pga. att de djur som beteendetestas ofta kommer utsättas för flera procedurer (beteendetest, läkemedelsadministrering) av ringa svårighet bedöms dessa försök vara av måttlig svårighetsgrad.
I vissa studier kommer vi använda djurmodeller för Parkinsons sjukdom och dessa bedöms vara av måttlig svårighetsgrad. Syftet med djurmodeller för Parkinsons sjukdom, i detta fall 6-OHDA, är att de skall efterlikna de symptom som man ser hos människor. Dessa neurodegenerativa sjukdomar, samt dess djurmodeller, är ju förenade med gradvis inträdande av motoriska beteendeförändringar. Efter 6-OHDA-behandling kan mössen börja uppvisa motoriska förändringar och något inskränkt rörelseförmåga. Mössen får postoperativ vård dagarna efter injektionen (smärtlindring, stödfoder). Den förväntade svårighetsgraden är alltså måttlig, utom för de djur som genomgår "Porsolt swim test/passivt undvikande", där svårighetsnivån är avsevärd.

3R - Ersätta (Replace)

Varför djur måste användas och varför djurfria alternativ inte går att använda.

Transgena djur är ett mycket användbart verktyg för att studera rollen av enskilda gener för specifika beteenden eller sjukdomsförlopp. Tekniken har förfinats och utvecklats så att nu är det möjligt att slå ut specifika gener i enskilda cellpopulationer som t.ex. nervceller. Genom att slå ut gener i nervceller kan vi studera geners betydelse för komplexa beteenden såsom depression och ångest, samt för läkemedelseffekter. Denna teknik är för nuvarande endast tillgänglig i möss och i ett fåtal fall, råttor också, såsom TAAR1 modell som vi strävar efter att studera. Dessa modeller är väldigt bra för att studera geners betydelse och djurfria alternativ är ej tillgängliga.

3R - Begränsa (Reduce)

Vad forskaren har gjort för att försäkra sig om att de använder det minsta möjliga antalet djur.

För att reducera antalet djur kommer vi vidta flertal åtgärder. Vi kommer att använda samma djur i flera av testen i största möjliga mån (upp till 6 beteendetest). När det gäller behandling med farmaka har vi gjort grundliga litteraturstudier kring vilka doser och tidsintervall som är lämpliga för respektive experiment. På detta sätt kan vi minska antalet doser och tidsintervall i varje experiment och följaktligen antal djur. Slutligen kommer vi också att använda det minsta antalet djur som samtidigt ger tillräcklig statistiskt underlag. Det bör dock påpekas att de vetenskapliga tidskrifter som vi ämnar publicera dessa studier i kräver alltid att ett visst minimiantal av experiment utförs. Detta varierar från försök till försök, men inga resultat kan publiceras utan statistiska underlag.

N139/16

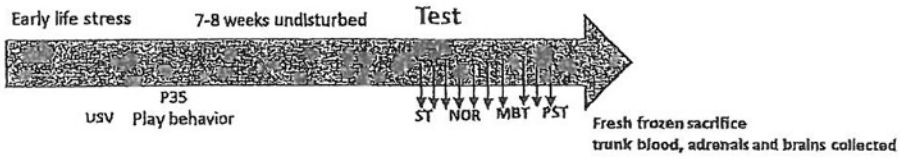
3R - Förfina (Refine)

Förklaring till valet av djurart och varför de metoder som används är de mest skonsamma med hänsyn till att uppnå syftet med försöket. Beskrivning vad forskaren gör för att minimera djurens eventuella lidande.

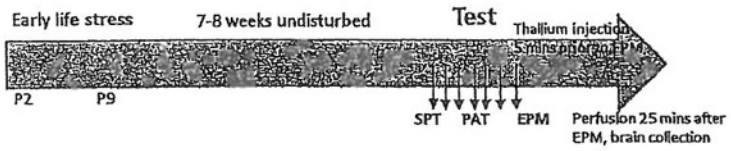
Vid experimenten kommer vi att minimera olusten för djuren genom hantering inför test och viloperioder mellan beteendetest. 6-OHDA-lesionerade djur kommer få postoperativ vård. Djuren kommer vägas inför varje beteendetest eller injektion, och avlivas om de uppvisar tecken på lidande. För djurens välmående förvaras de i burar berikade i enlighet med KIs berikningsplan.

N139/16

(A) Djuren kommer att offras i färskt fruset tillstånd och trunkblod, binjurar och hjärna samlas. Trunkblodet kommer att användas för att utföra en kortikosteron analys. Hjärnorna kommer att användas för att titta på uttrycket av stressmarkörer på gen eller proteinnivå.



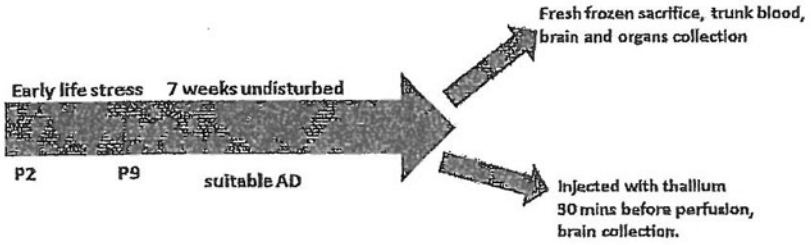
(B) Djuren kommer få en intraperitoneal injektion av tallium acetat eller tallium dietylditiokarbamat (TDDC) 30 min före perfusion. Tallium är en kaliumanalog och kan användas för att studera neuronal aktivitet. Efter perfusion, kommer hjärnan att beredas för att studera neuronal aktivitet.



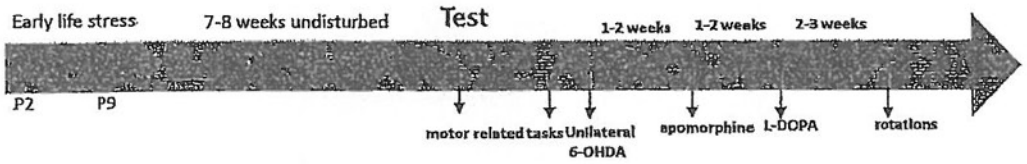
(C) Om vi ser uttalade effekter av tidig livsstress i våra KO linjer kommer vi att ge en lämplig antidepressiv (AD) i efterdyningarna av stress. Valet av AD kommer bero på de molekylära resultaten av tidigare experiment (A). Effekten av AD kommer att utvärderas genom att utföra beteendetester i vuxen ålder. Efter beteendetesterna kommer ett parti djur att offras i färskt fruset tillstånd och det andra partiet kommer att injiceras med tallium 30 minuter före perfusion. Vi förväntar oss att en lämplig AD kommer normalisera det förändrade beteendemönstret samt normalisera de förändrade

N139/16

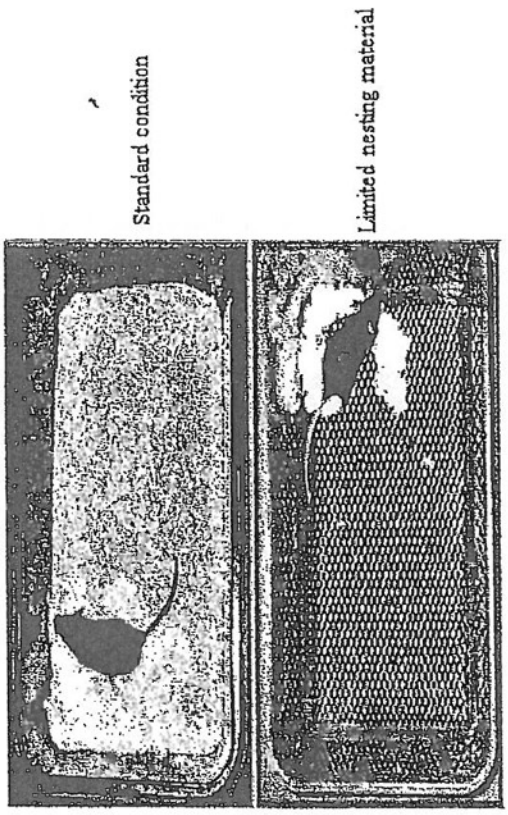
genuttrycken samt proteinnivåer i hjärnan. Detta skulle också ge oss insikt i verkningsmekanismen för den använda AD.



(D) Djuren kommer att genomgå ensidig lesionering med 6-OHDA efter den första omgången av beteendetestet. 2 veckor efter skadan kommer de att behandlas med apomorfin och rotationsbeteende studeras. Detta kommer att göras för att undersöka lesioneringens effekt. Därefter kommer djuren behandlas med L-DOPA eller saltlösning och undersökas i en motorisk uppgift



N139/16



N139/16
B1. A1

N139/16

Frågor och följdfrågor:

Först en kommentar:
Google translate, eller motsvarande, är ett väldigt bra hjälpmedel i många avseenden, men då programmen inte alltid klarar av att på korrekt sätt omvandla engelsk till svensk meningsbyggnad uppkommer oönskade syftningsfel. Dessutom kan översatta ord tappa sin betydelse, eller få en helt annan betydelse. Om ansökan blir svårläst och svårförståelig pga användandet av översättningsprogram kan sökanden bli nödgad att skriva om hela ansökan, något att tänka på till nästa ansökan. Hur som helst så kommer du att se att vissa frågor uppkommit sprunget ur ovan nämnda problematik.

- **Tack för denna kommentar. Vi har en svensktalande kollega som granskar och hjälper till att översätta alla ansökningar som är skrivna på engelska. Tyvärr fanns det i denna ansökan några sena tillägg till texten som inte granskades språkligt innan ansökan skickades in.**

1.
Användandet av ordet "gnagare" (eng. rodents), speciellt i den populärvetenskapliga delen av ansökan, när du egentligen specifikt menar mus och råtta (bland gnagare ingår även ekorre och bäver) är problematisk. Vi vill därför att du skriver om den populärvetenskapliga sammanfattningen där du tittar speciellt på de avsnitt/rubriker där djurslag beskrivs. Denna omarbetade version av populärvetenskaplig sammanfattning skickar du därefter till oss per e-post.

- **Vi har korrigerat den populärvetenskapliga sammanfattningen och bifogar den uppdaterade texten.**

Följdfråga:
Ni behöver skicka in en ny justerad PVS i den avsedda mallen där ni byter ut ordet "rodents" under rubriken *Använda djurarter* till "2000 möss och 1000 råttor".

- **Vi har korrigerat originalblanketten online för att specificera arterna. Tyvärr märkte vi att när man fyller i arterna var man tvungen att skapa två nya sub-sektioner av "Försökets genomförande" (punkt 4), en för vardera art. Därför är texten under "Försökets genomförande" i det närmaste identisk för möss och råttor frånsett att råttor inte genomgår tail-suspension test. Ansökan är skickad till föreståndare för godkännande av ändringarna.**

N13/16

2.
Punkt 3, hållandesätt. Vi förutsätter att djuren får mat/vatten ad lib, (om inte annat angetts vid försök). Och vad menas med "papper, alternativt miljöberikning i enlighet..." (om inte annat angetts vid försök)? Ska djuren få miljöberikning eller inte (om inte annat angetts vid försök)?

- **Även om detta inte har specificerats i punkt 3 skall djuren få mat och vatten ad lib som vanligt.**
  När det gäller kommentaren angående bomaterial ber vi om ursäkt för ett misstag. För att förtydliga: burarna innehåller bomaterial och miljöberikning. Den enda situation där djuren kommer att sakna miljöberikning anges i beskrivningen av ELS-protokollet.

3.
Det finmaskiga aluminiumnätet i ELS-försöken, finns risk att ungar eller mammor fastnar med tassarna i detta eller skadas fysiskt på annat sätt?

- **Gallret är byggt efter specifikationer på håldiameter och avstånd så att möss och/eller råttor tryggt kan gå över och vila på det utan att tassarna fastnar. Vi diskuterar för närvarande konstruktionen med ett produktionsbolag och troligen kommer nätet att byggas av akrylplast.**

4.
Vilka åtgärder vidtas, ex tillsynsrutiner, för att kontrollera att mamman inte skadar/äter ungarna vid ELS-försök?

- **Tidigare studier med denna metod har inte rapporterats ge ökad kannibalism. Vi är dock medvetna om de risker som finns när man framkallar stress i mus- och råttkullar. Från födseln till postnatal dag 9 kommer vi att fyra gånger dagligen observera mammorna och ungarna. Om vi konstaterar att mammor skadar ungar kommer vi återföra kullen till normala burförhållanden och kullen kommer att ingå i en annan experimentgrupp.**

5.
Social preferens/igenkännande-testerna: Vad menas med begreppet "motbalanseras"?

- **Begreppet "motbalanseras" innebär att den sida (höger eller vänster del av apperaturen) där unga och objekt placeras i sidokamrarna är jämnt fördelade.**

6.
Sukrospreferenstest: Vad menas med begreppet "enda hölje"? Förmodligen översatt från "single caging"?

N 135/16

- **Förtydligande: "...vi ser inte någon skadlig effekt av behålla ensamma djur under sukrospreferenstestet..." Vi beklagar detta fel.**

7.
Stressinducerad hypertermi: Termometerproben ska vara insmord med ex vaselin (inte bara "bör"). Ok?

- **Korrekt, termometern är alltid insmord med vaselin. Felaktig användning av ordet bör.**

8.
Uttrycket "max 6 olika tester per mus": Ska detta tolkas som max 6 olika typer av test (som kan komma att upprepas, ex. före/efter behandling), eller menas max 6 testtillfällen (då räknas alla ev. upprepningar in)?

- **Det som menas är att djuren genomgår högst 6 typer av test. Detta krävs då det finns några standardiserade test som kräver träning före testning (enligt beskrivningen).**

Följdfråga:
Nämnden behöver kunna göra en bedömning av maximal påverkan på de enskilda djuren:

Hur många testtillfällen totalt kan det max bli för ett djur?

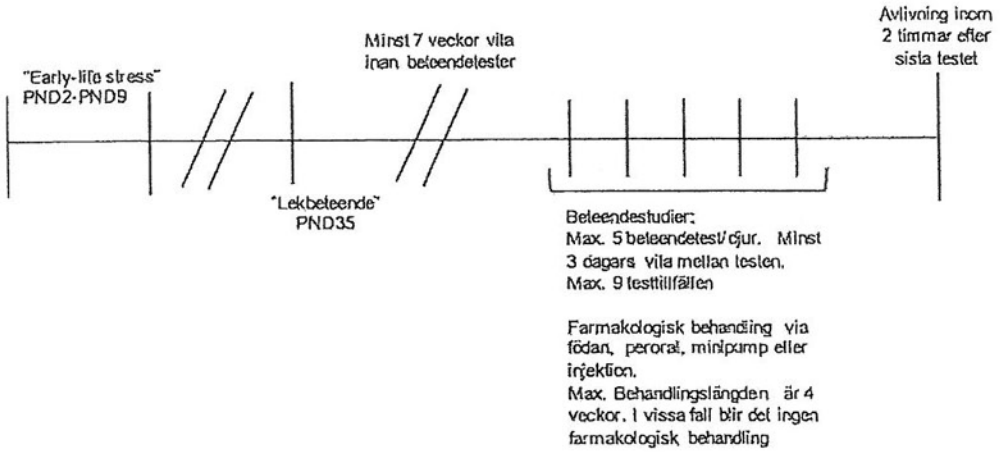
- **Vi uppskattar att i värsta fall (worst-case-scenario) kommer ett djur att genomgå 10 testtillfällen där djuret kommer att genomföra 6 olika typer av test. Vi vill dock påminna om att ett djur som genomför två testtillfällen av samma metod/test inte upplever samma nivå av aversion två gånger (se metodförklaringen).**

Vänligen bifoga ett "worst case scenario" flödesschema som visar vilka moment och test som kommer kombineras och (viktigt) tidsintervall mellan de olika testtillfällena för de djur som kommer utsättas för något test av avsevärd påverkan för djur som också genomgår 6-OHDA lesionering.

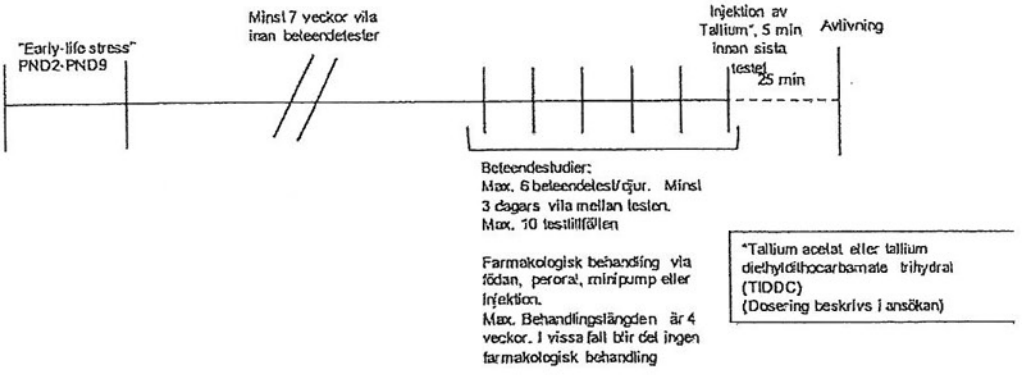
- **Rättelse: djur som genomgår 6-OHDA lesion under denna etiska ansökan kommer inte att genomgå något aversionstest. Endast motoriska tester som är relativt milda i svårighetsgrad används för dessa djur.**
- **Nedan återfinns uppdaterade och mer detaljerade scheman (A, B, C och D) som skall ersätta tidigare schema.**

N139/16

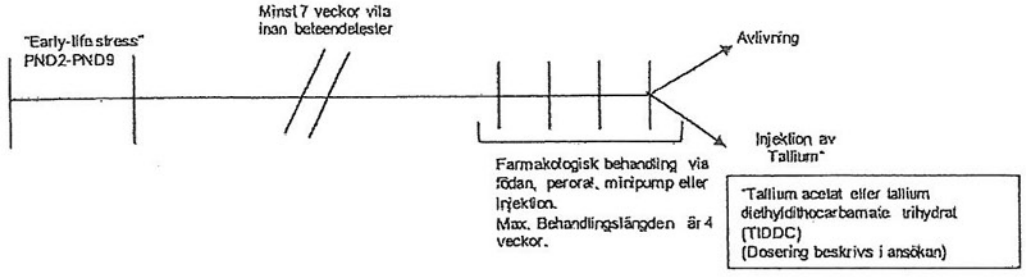
Scenario A:



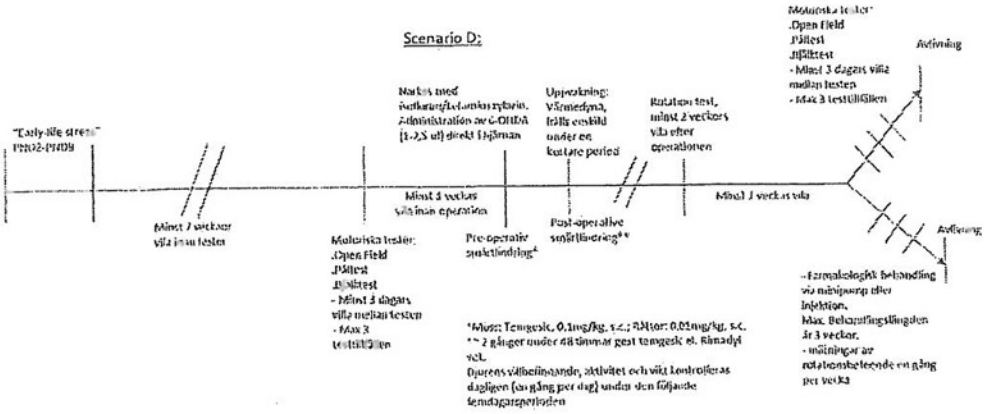
Scenario B:



Scenario C:



N 139/16



Redan bifogade flödesschema (A) innehåller inte 6-OHDA och där framkommer heller inte antal upprepningar och tidsintervall på ett klart sätt. Det redan bifogade flödesscheman (D) med 6-OHDA visar ingen kombination med beteendetest av avsevärd påverkan.

- **Rättelse: djur som genomgår 6-OHDA lesion under denna etiska ansökan kommer inte att genomgå något aversionstest. Endast motoriska tester som är relativt milda i svårighetsgrad används för dessa djur.**

Kommer passive avoidance (PA) testet att upprepas på ett enskilt djur? I så fall max hur många gånger?

- **PA tester kommer endast att genomföras en gång per djur. Vissa experiment, t.ex. passivt undvikande test bygger på klassisk betingning och kräver således ett obetingat stimulus (OS, elektrisk fotstöt) för att utlösa en obetingad respons (OR, undvikande av det mörka rummet). Som det beskrivs i ansökan, undersöker vi kognitiva svårigheter hos möss med depressiv/ångestladdad-fenotyp och undersöker därmed minnesförmågan för OS händelsen 24 h efter (bevarande/retentionstest). Dock, precis som beskrivs i ansökan, kommer vid retentionstestet endast latenstiden att gå till det mörka rummet att mätas och det appliceras ingen elektrisk stöt.**

9.
Exakt vilka tester ska utföras, alternativt inte utföras, på råtta (jämfört mus)? Kommer något djur genomgå mer än ett test av avsevärt grad (passive avoidance, porsolt swim test eller tail suspension test)?

- **Eftersom råttor inte kan testas i tail suspension kommer de endast testas i Porsolt swim test. Alla de tester som beskrivs i ansökan kan tillämpas på möss. OBS: Vi kommer aldrig utföra Porsolt swim test och tail suspension test på samma djurindivid (se nedan).**
- **Samma djur genomgår flera tester för att validera den observerade fenotypen. Vi kommer inte att tillämpa det maximala antalet beteendetester i alla experimentella uppsättningar. Vid beteende-**

U 139/16

experiment är det vanligt att använda åtminstone två olika experiment för varje beteendedomän (dvs motoriska, emotionella, kognitiva). Detta för att kunna erhålla en statistiskt säkert resultat att vissa funktioner förändras och därmed kunna dra korrekta slutsatser. Det kommer därför att finnas vissa uppsättningar av experiment där djuren genomgår passiv avoidance och Porsolt swim test.
Vilken kombination av beteendetester som är mest relevant kommer att avgöras av djurens välbefinnande och vetenskapliga kriterier. Djuren som genomgår kirurgi ska utsättas för minsta möjliga antal beteendetester.

- Efter ett icke-aversivt experiment (T.ex. Open field, NOR), kommer djuren ges 3 dagar vila. För aversiva experiment (t. ex. Passive avoidance, light/dark box), kommer djuren vila i en vecka.

10.
Varför behöver ni tillstånd att utföra "Tail suspension test" utöver "Porsolt swim test"? Och kan "Porsolt swim test" ersättas med ett s k "splash test". Om anhedoni, grad av depression/ångest ska mätas, kan splash testet vara ett alternativ. Om så inte är fallet vill vi ha en utförlig motivering till detta.

- Vi kommer aldrig utföra Porsolt swim test och tail suspension test i samma djur. Testen är i princip utbytbara med skillnaden att experimenten har olika praktiska problem, t.ex. klättrar C57/Bl6-möss gärna i tail suspension test vilket gör det svårare att genomföra testet i denna stam. Vi ämnar främst använda Porsolt swim test då många av våra stammar är av C57/Bl6-backgrund. Vi vill dock gärna behålla tail suspension test i vår ansökan i fall vi t.ex. skulle behöva validera tidigare forskningsresultat som erhållits med detta test. Eftersom råttor inte kan testas i tail suspension kommer dessa endast testas i Porsolt swim test.

- Tack för detta förslag. Vi kommer att överväga detta som ett kompletterande test vid observationer av stressfenotyp."Splash test" bedömer en annan kategori av beteende än "Porsolt swim test". Porsolt fortfarande den mest accepterade modellen för att bedöma depressiva och anti-depressiva beteendeprofiler.

11.
HPA-funktion: Hur påverkas djuren av ACTH-hormonfrisättningen och av dexametasonet, och hur långt efteråt avlivas djuren?

- Injektion av CRH eller dexametason påverkar olika delar av hypotalamus-hypofys-binjure (HPA) axelns funktion. Vi kommer att avliva djuren senast två timmar efter injektion. Denna tidsram behövs för att kunna observera olika stadier av aktivering och hämning av HPA-axeln. Inom denna tidsperiod, förväntas att djuren kommer att uppnå liknande nivåer av stress som uppstår till följd av

Porsolt swim stress. Proceduren kommer att tillämpas i studier med några av våra depressiva modeller, t.ex. P11 muterade mössa, där vi har preliminära data som indikerar en försämring av HPA-axeln svar på stress.

12.
Talliumbehandling: I er pilot på max 10 möss, vad exakt ska ni utvärdera som föranleder behovet av en pilot? Ingår bedömning av djurhälsa?

- **Vi kommer att använda cirka 8 djur för en pilot eftersom vi vill prova två olika typer av tallium: tallium acetat och tallium diethyldithocarbamate trihydrat (TIDDC), i två grupper av djur: 2 naiva djur (kontroll, ingen beteende test) och 2 djur med ett kort beteendetest (t.ex. Open field). Vi förväntar oss att observera högre nervaktivitet i djur som exponerats för en beteendeprov 30 minuter före talliuminjektion. Båda tallium acetat och TIDDC används för att mäta nervaktivitet men vi måste bedöma vilken typ som ger bäst signal i vår experimentella uppsättning och i våra djurstammar.**

Följdfråga:
Har ni någon information/uppfattning om hur djurens välbefinnande kan påverkas av de olika talliumbehandlingarna?

- **Tidigare studier har inte rapporterat någon negativ påverkan, av de doser vi beskriver, på djurens välfärd inom 30 min perioden mellan tallium injektionen och avlivning.**

13.
Farmakologisk behandling:

a) Avbryter ni, alltså avlivar ni djuret, vid tecken på peritonit?

- Ja.

b) Max antal injektioner, för enskild mus (inkluderande farmakologiska behandlingar, Brdu etc)?

- **Vid kronisk behandling kommer djuren att få en injektion per dag (maximalt 4 veckor). Djuren som ska få antagonist innan agonistbehandling kan få maximalt två injektionen per dag (antagonister vanligen ges 30 min före agonister).**

c) Observera att rekommenderad maxvolym i.p. för råtta är 10 ml/kg (ni har angett en volym på 50 ml/kg, vilket är för mycket, även på mus, där 20 ml/kg är rekommenderad).

N139/16

Möss kommer att injiceras subkutant (maxvolym: 0.25 ml) eller intraperitonealt (maxvolym: 0.5 ml). Råttor kommer att injiceras subkutant (maxvolym: 1 ml) eller intraperitonealt (maxvolym: 2 ml).

d) Vid längre behandlingar (upp till tre veckor), kan minipump användas? Motivera.

- **Tack för detta förslag. Osmotiska minipumpar kan vara ett bra alternativ till längre perioder av dagliga injektioner, särskilt i råttor där hanteringen är mer känslig. Vi kommer att rådfråga veterinär för att bedöma om nyttan av den osmotiska pumpen är större än den stress som uppkommer vid inplantatering. Ett argument mot pump är att vi vill minimera antalet kirurgiska ingrepp per enskilt djur eftersom vissa grupper av djur redan genomgår 6-OHDA lesionering. Alternativt, hos råttor, kan vi använda peroral administreringsväg om det är lämpligt för läkemedlet.**

Följdfråga:
Alternativet med minipump bör ha diskuterats med veterinär innan ansökan. Vilken är veterinärens bedömning?

- Detta alternativ har nu diskuterats med veterinär [redacted] Rekommendationen från [redacted] är att användandet av minipump ska diskuteras med henne från fall till fall när en detaljerad experimentplanering finns klar. Hon håller med att fördelarna av att använda subkutana minipumpar troligtvis är större än nackdelarna och endast i speciella fall, framför allt när det gäller råttor.

Om minipump kommer användas kommer ni i så fall använda minsta möjliga minipump s.c. samt använda anestesi vid op samt buprenorfin post-op minst ett dygn?

- Ja, vi kommer att använda minipumpar som är rekommenderade för respektive art och ta hänsyn till respektive pumps krävda volymer och behandlingslängd. Isofluran kommer att användas som bedövningsmedel. Smärtlindring kommer att vara Temgesic, upp till 2 dagar, i rekommenderad och, i ansökan, indikerad dos.

14.
Rotationstestet: Går effekten av L-DOPA potentieringen med apomorfin/benserazid alltid ur efter 30 min, eller finns risk att springandet i cirklar kvarstår längre och därmed negativt påverkar djurens välbefinnande över längre tid? Avlivar ni i så fall djur om rotationsbeteendet kvarstår?

- ☐ **Enligt vår erfarenhet, överstiger inte rotationsbeteende följande tidsramar;**
  Apomorfin: 1 timme
  L-DOPA: 1,5 timmar

- ☐ **Vanligtvis ser vi till att underlätta och ge extra omvårdnad till djur som genomgår denna behandling (t.ex. lägger vi mat och vatten på**

N 139/16

burgolvet som beskrivs tidigare i ansökan).

Följdfråga:
Kommer djur som har kvar rotationsbeteende eller avviker kraftigt på annat sätt än förväntat efter de ovan angivna tidsramarna att avlivas?

- Ja

15.
Avbrytningspunkter: Får vi be om förtydliganden angående avbrytningspunkter baserade på KI-mallen?

Avbrytningspunkt innan försök (dvs avel t ex): **0.3** (alltså när uppnår 0.3, inte samma som >0.3 som eg. betyder att försök avbryts vid 0.4). Ni har angett >0.3, men det brukar vara =0.3, varför vi frågar.

Avbrytningspunkt i försök, men utan 6-OHDA injektion: **0.3** (alltså när uppnår 0.3, inte samma som >0.3 som eg. betyder att försök avbryts vid 0.4)

Avbrytningspunkt i försök med 6-OHDA injektion: **0.7** (alltså när uppnår 0.7, inte samma som >0.7 som eg. betyder att försök avbryts vid 0.8)

- **Avbrytningspunkten är >0,3 på KI:s bedömningsmall före försök och vid avel. Tecknet för > har tyvärr kommit bort på tredje raden under "Beskrivning av avbrytningspunkten" Vi beklagar det. Avbrytningspunkten är alltså sådan att vid 0,4 avlivas djuren alltid (utom de 6 OHDA behandlade, som avlivas vid >0,7 alltså vid 0,8. Där är 0,4 inräknat för rörelsestörning). Det betyder att kraftig påverkan på någon parameter utesluts (förutom, som sagt, för rörelse vid 6-OHDA behandling).**

16.
Vid smärtlindring med Temgesic och annan anestesi, följer ni veterinärernas rekommendationer? Nu anges t ex en koncentration på 0.3 mg/ml av Temgesic, vilket inte säger något om slutlig dos för mus respektive råtta.

- **Vi följer veterinärernas rekommendation. I beskrivningen av 6-OHDA lesioneringen angav vi att dosen är 0,1 mg / kg, subkutant, men vi missade att förklara att detta är dosen för möss. Dosen för råttor är 0,01 mg / kg. Tack att ni fann misstaget att beskriva koncentrationen istället för dosen.**

Följdfråga:
Ni har angett den lägsta dosen för råtta och högsta för mus. Kommer även råttorna få den högre dosen, dvs 0,05 mg/kg?

- Vi har översiktlig diskuterat med veterinären och ja, råttorna kommer att få upp till 0,05 mg/kg

N 139/16

17.
Lek-bråk: Hur ändras hemburen och låter ni ändringen kvarstå efter 10 min observation eller ändras buren tillbaka igen? Hur ofta kommer ändring av buren ske och med vilket tidsintervall?

- **Burarna ska ändras endast en gång innan lekbeteende testet. Djuren kan bo i den nya buren eftersom det kommer att motsvara en normal bur. Djur är i allmänhet mer aktiva efter att buren ändras, så därför ändrar vi buren endast före lekbeteende testet.**

18.
Eftersom ni kommer använda unga djur i försök som normalt bör öka i vikt är det lämpligt att jämföra viktnedgång med normalviktskurvan för aktuell stam och ålder och inte det enskilda djurets startvikt. Kommer ni jämföra med normalviktskurvan?

- **Tack för denna viktiga kommentarer. Ja, vi kommer att jämföra med normalviktskurvan.**

B:1, B

Stockholms djurförsöksetiska nämnd

Ansökan N139/16

Titel: "Undersökning av tidig livsstress i genetiska gnagarmodeller för depression/ neurodegenerativ sjukdom".

Beredningsgrupps 2 förslag till nämndens ställningstagande

Försöket enligt ansökan bör

- Godkännas med följande villkor:

1. Att avbrytning sker vid 0.3 poäng enligt KI-mallen före försök och vid avel.
2. Minipump ska ersätta upprepade ip-injektioner om det är möjligt och när veterinär rekommenderar det.

Motivering:

Ansökan är väl motiverad och relevant för forskning kring depression som uppkommer som följd av motgångar tidigt i livet. Tidig livsstress tror man också ökar risken för neurologiska sjukdomar såsom Parkinsons sjukdom. Mus- och råttungar utsatta för tidig livsstress genomgår olika behandlingar och beteendetester för att utvärdera effekt på depression. Därutöver utvärderas sambandet mellan tidig livsstress och insjuknande i Parkinsons sjukdom. Inga aversionstester utförs på djur som används för Parkinsons-försök och i de fall aversionstester används utförs de vid endast vid ett tillfälle (terminalt). Försöken antas ge viktig kunskap om hur hjärnan påverkas av tidig livsstress och på så sätt förstå mekanismerna bakom depression och kopplingen till neurodegenerativa sjukdomar, vilket är förutsättningen för att kunna frambringa bättre behandlingar för dessa patienter i framtiden.

Giltighetstid bör vara:

- Fem år från godkännandedatum

Försökets svårhetsgrad bedömer beredningsgruppen som:

- Avsevärd svårhet

Utvärdering i efterhand

Beredningsgruppen föreslår att försöket ska utvärderas i efterhand

- Ja

Om ja, i vilka delar och ur vilken aspekt samt motivering:

- I vilka avseenden ett s k splash-test kan ersätta Porsolt swim test för att mäta grad av depression och ångest (anhedoni). Visar utvärderingen att splash test kan ersätta Porsolt swim test (om än så bara i vissa specifika avseenden) innebär detta en betydande minskad negativ påverkan på djurets välbefinnande.

Avgift

Eftersom ansökan faller under följande kategori enligt 2a § Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 2008:19) om avgifter i vissa ärenden enligt 67 § djurskyddsförordningen (1988:539):
Beredningsgruppen bedömer avgiften som kategori

4. 6 000 kr

Handläggningstid

- Handläggningstiden kommer såvitt beredningsgruppen nu kan bedöma inte bli längre än 40 arbetsdagar.

Ändringar som påverkar den populärvetenskapliga sammanfattningen

-Ja

Sökanden har uppdaterat sin PVS. Ändringen gäller rubriken djurslag under vilken "rodents" bytts ut mot "råttor och möss".

Komplettering (bifogas som bilagor)
Ansökan har kompletterats:
Via mail den 19:e och 21:a september 2016.

Undantag
Försöksledaren har i förekommande fall sökt de undantag som framgår av ansökan.

Ange deltagare i beredningsgruppen samt datum för sammanträde

[redacted]