



De regionala djurförsöksetiska
nämnderna

BESLUT
2020-10-08

Dnr 10406-2020
Delg.

Stockholms djurförsöksetiska nämnd

Din ansökan om etiskt godkännande av djurförsök, se bil. A

Nämndens beslut

Stockholms djurförsöksetiska nämnd bifaller din ansökan och godkänner ditt försök ur etisk synpunkt och du kan därmed utföra ditt försök enligt nedanstående villkor.

Nämnden beslutar att försöket ska utvärderas i efterhand i det avseende som anges i bil. A:2.

Nämnden bedömer försökets svårhetsgrad som avsevärd.

Nämnden bestämmer avgiften för prövningen till 15 000 kr.

Detta godkännande gäller till och med den 8 oktober 2025.

Villkor för beslutet

Beslutet gäller under förutsättning att:

1. Försöksledare för försöket är [REDACTED]
2. Föreståndare är [REDACTED]
3. Försöket genomförs på i bil. A angivna försöksdjursanläggningar med där angivna dnr för anläggningarna.
4. Försöket genomförs i enlighet med bil. A och med i bil. A:1 redovisade kompletteringar.
5. Ett försök med centrala mekanismer (4.2.1, åtgärd 6,7,8 och 9) får inte kombineras i samma djur med ytterligare en åtgärd med centrala mekanismer, så som specificeras i 4.2.1, åtgärd 10. Åtgärd 10 i försöksgrupp 2 får därmed inte utföras.

Beskrivning av ärendet

Du som försöksledare har ansökt om etiskt godkännande av djurförsök enligt 21 § djurskyddslagen (1988:534) för försöket "Centrala mekanismer i sensoriska nätverk

som styr känsel och smärta”. Du har lämnat in en ansökan där du beskriver hur försöket ska genomföras och vilket lidande som kan förväntas eller som djuren maximalt får utsättas för. Du har också angett vilken nytta du förväntar dig att detta försök kommer att ha för människan, djur eller miljön. Du har kompletterat ansökan med information som redovisas i bil. A:1.

Motivering

Gällande regler

Av 21 § djurskyddslagen framgår bland annat följande.

- För att få använda sig av djur i ett djurförsök krävs ett godkännande från etisk synpunkt av en regional djurförsöksetisk nämnd innan användningen får påbörjas.
- Vid prövningen av ett sådant ärende ska försökets betydelse vägas mot lidandet för djuret. Försöket ska utifrån graden av lidande hos djuret klassificeras i någon av kategorierna terminal, ringa svårhet, måttlig svårhet eller avsevärd svårhet.
- Vid prövningen av ärendet ska det även beslutas om försöket ska utvärderas i efterhand.
- En djurförsöksetisk nämnd får återkalla ett godkännande om djurförsöket inte utförs enligt godkännandet.

Av 2 a § Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 2008:19) om avgifter i vissa ärenden enligt 67 § djurskyddsförordningen (1988:539) framgår att den som ansöker om etiskt godkännande av djurförsök ska betala en avgift enligt följande:

1. Ansökan om ändring av ett befintligt etiskt godkännande som riskerar att inverka negativt på djurs välfärd.....6 000 kr
2. Ansökan som rör pilotstudie och ärende som endast innebär användning av djur som inte hålls i en försöksdjursanläggning, dvs. privatägda djur, djur i anläggning som är godkänd för offentlig förevisning enligt 37 § djurskyddsförordningen (1988:539) eller fritt levande vilda djur.....8 000 kr
3. Ansökan som inte omfattas av punkt 1, 2 eller 3.....15 000 kr
4. Ett försök med centrala mekanismer (4.2.1, åtgärd 6, 7, 8, och 9) får inte kombineras i samma djur med ytterligare en åtgärd med centrala mekanismer, så som specificerats i 4.2.1. Åtgärd 10 i försöksgrupp 2 får därmed inte utföras.

Nämndens bedömning

Nämnden bedömning, se bil. A:2.

Svårhetsgraden för försöket fastställs till avsevärd.

Nämnden bedömer att ansökningen faller under 2 a § 3 Statens jordbruksverks föreskrifter (SJVFS 2008:19) om avgifter i vissa ärenden och att du därför ska betala 15 000 kr.

Hur du överklagar

Du kan överklaga detta beslut till Centrala djurförsöksetiska nämnden. Överklagandet ska vara skriftligt. När du överklagar ska du skriva

1. vilket beslut du överklagar,
2. hur du vill att beslutet ska ändras, och
3. varför du tycker att det ska ändras.

Du ska skriva till Centrala djurförsöksetiska nämnden men skicka eller lämna överklagandet till Stockholms djurförsöksetiska nämnd, Stockholms tingsrätt, box 8307, 104 20 Stockholm

Ditt överklagande måste ha kommit in till Stockholms djurförsöksetiska nämnd inom tre veckor från den dag som du tagit del av beslutet. För offentlig part räknas dock tiden för överklagande från beslutsdagen.

Övriga upplysningar

Om du har betalat en annan avgift än den som nämnden har beslutat kommer du att få en tilläggsfaktura eller kreditfaktura från Jordbruksverket. Om du överklagar avgiftsbeslutet kommer en kopia på överklagandet att skickas till Jordbruksverket så att verket tillfälligt kan stoppa fakturan i vårt ekonomisystem till dess att överklagandet har avgjorts. Beroende på utgången ska fakturan därefter antingen betalas omgående eller makuleras.

Om du vill göra ändringar i detta beslut behöver du skicka en ansökan om ändring av ett befintligt etiskt godkännande till den regionala djurförsöksetiska nämnden. Nämnden bedömer i så fall om ändringen riskerar inverka negativt på djurs välfärd eller inte och om en ny etisk prövning behöver göras. Det krävs en avgift för ändringar i ett befintligt etiskt godkännande.

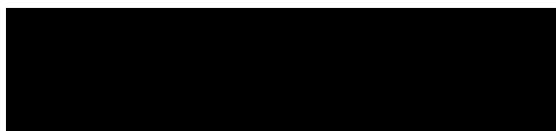
Om föreståndare eller försöksledare ska bytas ut under detta godkännandes giltighetstid är detta också en sådan ändring av beslutet.



Vice ordförande i Stockholms djurförsöksetiska nämnd

Nämnden skickar kopia för kännedom till

Länsstyrelsen i Stockholms län



Sökande

[REDACTED]
Karolinska institutet
MBB
Solnavägen 9, Biomedicum 6C, 17177 Stockholm
[REDACTED]

Stockholms djurförsöksetiska nämnd
Stockholms tingsrätt Box 8307
104 20 STOCKHOLM
stockholm@rdn.jordbruksverket.se

Ansökan om etiskt godkännande av djurförsök

Ansökan är granskad och godkänd av föreståndare [REDACTED]

Elektroniska underskrifter för denna handling:

I egenskap av försöksledare medger jag att ansökan skickas till den regionala djurförsöksetiska nämnden.

För att kunna verifiera underskrifterna kan du behöva öppna detta dokument i exempelvis Adobe Reader.

Filer som ingår

2020-06-11_1727-02 Ansökan om etiskt godkännande av djurförsök.pdf

Kontrollsumma (SHA-256): D75D17C4E5BF6D568DCDC90D5962AFDFBCB75D83473CEBF32FF10BEE50568625

2020-06-11_1727-03 Populärvetenskaplig sammanfattning.pdf

Kontrollsumma (SHA-256): BE3E4BF08CAD16EE5E24A8D076DB0EBF7839D5E82E9337214E688F2B7FA580F5

2020-06-11_1726-04 Bilaga [REDACTED]

Kontrollsumma (SHA-256): 6B3BB96001B1D9AC254F85ACD7E0D3136A37AD8D50E07D20F656496D2038DE91

Ansökan om etiskt godkännande av djurförsök

Tidigare inskickade versioner av ansökan

Ansökans id 3130

Ansökan har inte skickats in tidigare

Innehållsförteckning

1 Grunduppgifter	3
1.1 Försöksledare (Sökande)	3
1.2 Ansvarig veterinär	3
1.3 Tillstånd att använda försöksdjur	3
1.4 Etisk nämnd	5
1.5 Försökets titel	5
1.6 Övriga upplysningar	5
2 Syfte m.m	6
3 Djurarter m.m	9
3.1 Mus (<i>Mus musculus</i>)	9
4 Försökets genomförande	11
4.1 Försöksgrupp: Avel och gemensamma procedur	11
4.1.1 Undergrupp: Avel och gemensamma procedur	12
4.2 Försöksgrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet	16
4.2.1 Undergrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet	16
4.3 Försöksgrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta	37
4.3.1 Undergrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta	37
5 Undantag, sammanfattning	51

1 Grunduppgifter

1.1 Försöksledare (Sökande)

Namn: [REDACTED]
Organisation: Karolinska institutet
Institution/avdelning: MBB
c/o:
Adress: Solnavägen 9, Biomedicum 6C, 17177 Stockholm
E-postadress: [REDACTED]
Telefonnummer: [REDACTED]
Mobilnummer:
Faxnummer:

1.2 Ansvarig veterinär

Namn: [REDACTED]
c/o:
Adress: Komparativ Medicin, Biomedicum, 17165 Stockholm
E-postadress: [REDACTED]
Telefonnummer:
Mobilnummer:

1.3 Tillstånd att använda försöksdjur

Nedan visas uppgifter från tillståndet som det såg ut när denna sammanställning gjordes – eventuella ändringar som har gjorts i tillståndet efter det visas inte här.

Diarienummer:	5.2.18-3236/17
Organisation:	KAROLINSKA INSTITUTET
Institution:	Avdelningen för komparativ medicin
Slutdatum:	2022-04-18
Tillståndshavare:	[REDACTED]
Föreståndare:	[REDACTED]
Veterinär/expert:	[REDACTED]
Ändamål:	Biomedicinsk forskning i syfte att förstå grundläggande livsfunktioner, sjukdomsmekanismer, utveckla nya/förbättra behandlingar av människans sjukdomar, samt utbildning och träning i LAS

Djurarter:	Gerbil (Gerbillinae), Hamstrar (Cricetinae), Kanin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), Marsvin (<i>Cavia porcellus</i>), Mus (<i>Mus musculus</i>), Råtta (<i>Rattus norvegicus</i>), Signalkräftor (<i>Pacifastacus leniusculus</i>), Zebrafisk (<i>Danio rerio</i>), Spansk revbensalamander (<i>Pleurodeles waltl</i>), Afrikansk klogroda (<i>Xenopus laevis</i>), Mexikansk axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>), Vattensalamander (<i>Notophthalmus viridescens</i>), Västafrikansk klogroda (<i>Xenopus tropicalis</i>), Nejonöga (<i>Lampetra fluviatilis</i>), Mindre skogsmus (<i>Apodemus sylvaticus</i>), Gräsand (<i>Anas platyrhynchos</i>), Iller (<i>Mustela putorius</i>), Krabbnak (Macaca fascicularis), Nordamerikansk näbbmus (<i>Cryptotis parva</i>), Rhesusapa (<i>Macaca mulatta</i>), Större skogsmus (<i>Apodemus flavicollis</i>), Sorkar (<i>Arvicolinae</i>), Tamsvin (<i>Sus scrofa domestica</i>)	
Specifika villkor:		
Hållandesätt:	Försöksdjursanläggning	
Försöksdjursanläggningar:	32-2748/91	Institutionen för farmakologi
	34-5480/94	Gärtuna, byggnad 681R
	35-6352/01	Karolinska Institutet, Fysiologiska Institutionen Hus 95:21
	34-3590/94	95:3, södra delen, Karolinska institutionen
	35-998/99	Astrid Fagreuus laboratorium (hus 95:56)
	35-765/01	Astrid Fagreuus laboratorium (hus 95:56)
	31-2487/10	Astrid Fagreuus Lab
	31-5159/10	Astrid Fagreuus lab
	31-3029/11	Berzelius väg 35, rum B-121
	31-495/12	rum F224 och F230 och 231 i byggnad 95:33
	5.2.18-2239/13	Wallenberg, Hus 95:17 med adress Von Eulers väg 5 och Berzelius väg 17, Stockholm.
	35-1079/02	Byggnad 95:33, rum F 224 och F 230.
	5.2.18-11066/13	Retziuslaboratoriet, byggnad 95:55, Retzius väg 8, Stockholm
	5.2.18-8359/15	rum A1:01011/12 och A3:01038/39 i byggnad A1 och A3 samt rum R300B005 i MR center
	5.2.18-11233/15	KM Wallenberg, hus 95:17 och 95:48
	5.2.18-11254/15	rum 224 samt rum 231 i byggnad 95:33
	5.2.18-12375/15	Berzelius väg 35, rum B-117a

1.4 Etisk nämnd

Stockholms djurförsöksetiska nämnd
Stockholms tingsrätt Box 8307
104 20 STOCKHOLM
Telefon: 08 561 650 00
Fax: 08-653 34 44
stockholm@rdn.jordbruksverket.se

1.5 Försökets titel

Centrala mekanismer i sensoriska nätverk som styr känsel och smärta

1.6 Övriga upplysningar

Godkännandets giltighetstid

Försöket beräknas pågå till 2025-05-30

Samråd

Samråd har skett enligt 3 kap. 4 § L 150.

Personalens kompetens

De personer som är involverade i försöket har tillräcklig kompetens enligt 6 kap. L 150.

Sekretess

Önskar sekretess för vissa uppgifter i ansökan.

Betalning

Betalningsmetod:	Faktura
Ordernummer:	97874
Belopp:	15 000 kr

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 hälsa eller välfärd
- 8 Skydd av den naturliga miljön för att bevara djurs hälsa eller välfärd
- 9 Rättsmedicinska undersökningar
- 10 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.
- 11 Framställning och upprätthållande av en genetiskt modifierad djurstam
- 12 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.

Själva känslan av smärta finns i vår hjärna, även om smärtan upplevs som att vara i tex i våra muskler, leder eller ett sår i huden. Detta smärtsystem är livsviktigt och gör att vi kan skydda oss mot skada och också ta hand om befintliga skador så att kroppen kan läka. Tyvärr kan det gå fel i smärtbanorna vilket leder till obotlig kronisk smärta. Hjärnan har dock en mycket kraftig påverkan hur vi upplever smärta och hur mycket smärta vi känner. Det är tex ett välkänt faktum att sömn, stress, ångest, oro, upphetsning, trauma och neuropsykiatriska sjukdomar kan väsentligt påverka upplevelsen av smärta och denna påverkan har sitt ursprung i hjärnan. Andra exempel på betydelsen av hjärnans kontroll av smärta är effekten av meditation vid kronisk smärta, placebo effekten och den förvånansvärt lindriga smärtan hos allvarligt skadade soldater i krig, vilket först beskrevs 1946 av Henry K. Beecher. Ett annat exempel på hur kraftfull hjärnan är för smärtekänslighet som även dom som inte lider av kronisk smärta kan lätt kan relatera till är tex vaccination av ens barn. Om barnet distraheras så fokus inte ligger på injektionen så upplevs den inte alls lika smärtsam. Väldigt lite är känt hur detta fungerar neurobiologiskt, dock finns viss begränsad kunskap. Vi vet tex att det finns nervbanor från hjärnan ner i ryggmärgen som bestämmer hur mycket av smärtsignalerna från vävnaden som "tillåts" komma från kroppen in i hjärnan. En del av de cellansamlingar (kärnor) i hjärnan som är inblandade i denna process har identifierats såsom tex "rostroventrala medullan". Dock saknas kunskap om vilka celler som är inblandade, vilka nervbanorna är (kontakterna mellan olika nervceller) samt inblandade mekanismerna som "bestämmer" hur mycket smärta vi känner. Syftet med dessa försök är hitta inblandade neuron/cellkärnor i hjärnan och förstå hur dom används för att öka eller minska smärta.

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.

Central mekanism (om inte används i kronisk smärt modell): upp till 6 månader

Neuropatisk smärta: upp till 3 månader efter nervskadekirurgi

Reumatisk artrit: upp till 8 månader efter LPS-induktion

Koloni och avelsdjur: max 24 månader eller efter ca 6 kullar

Generiska åtgärder: slutpunkten bestäms av vilken modell de ingår i.

Tid räknas från först måttlig/avsevärd åtgärd, d.v.s. metoder som t.ex. s.c., i.p., p.o. eller milda sensorisk testning sätter inga specifika slutpunkter utan då använder vi slutpunkter för koloni och avelsdjur.

Beskrivning av nyttan för människa, djur eller miljö

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.

Runt 20% av befolkningen lider av kronisk smärta och ca 1/3 av dessa har så svåra smärtor att det påverkar deras liv avsevärt. Trots att kronisk smärta orsakar mycket lidande, saknas adekvata läkemedel för smärtlindring. De tillgängliga smärtlindrande läkemedlen har dålig effekt och fungerar bara på en del av de som lider av kronisk smärta. Det har inte tagits fram något konceptuellt nytt läkemedel för behandling av smärta på många årtionden. Genom att hitta dom nervceller som styr hur mycket smärta som hjärnan tillåter att vi känner hoppas vi förklara varför smärta ökar vid samsjuklighet (komorbiditet) såsom ökad smärta vid undersövdhet, långvarig stress, ångest, oro, depression och andra neuropsykiatriska sjukdomar såväl som minskad vid tex kortvarig stress. Vi kommer också att kunna förklara hur kraftfullt detta system är och om det till och med helt kan stänga av smärta. Denna kunskap är viktig i sig och kan förklara vad som händer vid olika smärttillstånd och kan leda till att vi hittar markörer som gör att man kan mäta hur olika delar av detta system används i olika patienter/smärttillstånd. Kunskapen kan också göra att vi kan hitta helt nya vägar för att ta fram nya läkemedel mot kronisk smärta.

Egen etisk avvägning

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

Kronisk smärta är vanligt förekommande i samhället och leder till stort lidande och en nedsatt allmänfunktion och arbetskapacitet. Det är också mycket kostsamt för samhället. "Outhärdliga smärta" är en term som återspeglar hur allvarligt det är för många. Det kan vara svårt att förstå hur stort lidande det orsakar om man inte själv lider av någon av de kroniska smärtsyndromen. Jag har en viss inblick genom att jag ibland kontaktas av människor som är mitt i detta lidande och söker en förklaring. Det finns i de flesta fall inget sätt att lindra tillståndet! De flesta av våra djurmodeller som vi använder oss av leder inte till lika kraftig smärta som patienter ibland upplever och i det är osannorlikt att ens de djur som är av avsevärd åtgärd i vår ansökan (aktivering av centrala mekanismer, t.ex. kronisk stress), vilket används bara på ett fåtal av djur och under en begränsad tidsperiod, kommer i närheten av det lidande som väldigt många människor i vårt samhälle tvingas leva med - varje dag, varje år, för många hela livet.

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.

Eftersom målet med detta projekt är att studera samspelet mellan olika nervcellspopulationer, finns inga alternativa in vitro metoder. Vi måste använda djurmodeller. Val av djurmodell avgörs av hur relevanta de är för smärta hos människa samt hur experimentellt betydelsefull djurmodellerna är. Möss kommer användas i mycket bra genetiska experimentella metoder som är väl utvecklade och reproducerbara.

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.

Under vårt tidigare tillstånd N47/13 använde vi cirka 6000 djur per år (födda i vår koloni). Eftersom denna del av projekt är mindre, förutser vi att behovet kommer att bli 3000 födda djur per år. I 5 år blir det maximalt $5 \times 2800 = 14000$ djur. Dessa är antal uppfödda djur. Vi förväntar oss att ca 25% av dessa (ca 3500) kommer att användas i faktiska experiment för alla modeller (framför allt de med rätt genotyp, ålder osv.)

3 Djurarter m.m

3.1 Mus (*Mus musculus*)

Antal: 14000

Motivering av valet av djurart

Mus är den optimala djurarten då det finns ett brett urval av stammar (liksom tekniker för att producera dessa) som tillåter användning av olika molekylära verktyg, såsom site-specifik rekombination (Cre, Dre etc.), knock-out, knock-in, optogenetisk och annan syntetisk aktivering av nervbanor med flera. Mus är den enda arten med genetiska modeller framtagna. De flesta tillgängliga beteendetester utvecklades och optimerades för möss.

Hållandesätt

- Försöksdjursanläggning
 - 5.2.18-2239/13 Wallenberg, Hus 95:17 med adress Von Eulers väg 5 och Berzelius väg 17, Stockholm. - Djuren förvaras i burar enligt lagstiftning tex IVC eller Isocage. Samtliga djuravdelningar följer Karolinska Institutets miljöberikningsplan. Djuren grupphålls i möjligaste mån, om experiment eller veterinärmedicinska skäl inte föreligger eller om hane med unik genotyp föds i en kull och inte kan poolas, avelshonar som separeras från en avel, plugganar. För kolonidjur inklusive avelsdjur sker detta max 3 månader, i experiment kan andra tider gälla vilket beskrivs, där det är lämpligt, under respektive Försöksgrupp. Eventuella problem handläggs i samråd med veterinärerna vid Karolinska Institutet. Möss kan komma att föras över på andra godkända etiska tillstånd och kan i samband med detta byta djurhus
 - 5.2.18-11233/15 KM Wallenberg, hus 95:17 och 95:48 - Djuren förvaras i burar enligt lagstiftning tex IVC eller Isocage. Samtliga djuravdelningar följer Karolinska Institutets miljöberikningsplan. Djuren grupphålls i möjligaste mån, om experiment eller veterinärmedicinska skäl inte föreligger eller om hane med unik genotyp föds i en kull och inte kan poolas, avelshonar som separeras från en avel, plugganar. För kolonidjur inklusive avelsdjur sker detta max 3 månader, i experiment kan andra tider gälla vilket beskrivs, där det är lämpligt, under respektive Försöksgrupp. Eventuella problem handläggs i samråd med veterinärerna vid Karolinska Institutet. Möss kan komma att föras över på andra godkända etiska tillstånd och kan i samband med detta byta djurhus
 - KM-Biomedicum: 5.2.18-19251/17 - Djuren förvaras i burar enligt lagstiftning tex IVC eller Isocage. Samtliga djuravdelningar följer Karolinska Institutets miljöberikningsplan. Djuren grupphålls i möjligaste mån, om experiment eller veterinärmedicinska skäl inte föreligger eller om hane med unik genotyp föds i en kull och inte kan poolas, avelshonar som separeras från en avel, plugganar. För kolonidjur inklusive avelsdjur sker detta max 3 månader, i experiment kan andra tider gälla vilket beskrivs, där det är lämpligt, under respektive Försöksgrupp. Eventuella problem handläggs i samråd med veterinärerna vid Karolinska Institutet. Möss kan komma att föras över på andra godkända etiska tillstånd och kan i samband med detta byta djurhus
- KM-Annexet: 5.2.18-19252/17 - Djuren förvaras i burar enligt lagstiftning tex IVC eller Isocage. Samtliga djuravdelningar följer Karolinska Institutets miljöberikningsplan. Djuren grupphålls i möjligaste mån, om experiment eller veterinärmedicinska skäl inte föreligger eller om hane med unik genotyp föds i en kull och inte kan poolas, avelshonar som separeras från en avel, plugganar. För kolonidjur inklusive avelsdjur sker detta max 3 månader, i experiment kan andra tider gälla vilket beskrivs, där det är lämpligt, under respektive Försöksgrupp. Eventuella problem handläggs i samråd med veterinärerna vid Karolinska Institutet. Möss kan komma att föras över på andra godkända etiska tillstånd och kan i samband med detta byta djurhus
- 35-998/99 Astrid Fagreus laboratorium (hus 95:56) - Djuren förvaras i burar enligt lagstiftning tex IVC eller Isocage. Samtliga djuravdelningar följer Karolinska Institutets miljöberikningsplan. Djuren grupphålls i möjligaste mån, om experiment eller veterinärmedicinska skäl inte föreligger eller om hane med unik genotyp föds i en kull och inte kan poolas, avelshonar som separeras från en avel, plugganar. För kolonidjur inklusive avelsdjur sker detta max 3 månader, i experiment kan andra tider gälla vilket beskrivs, där det är lämpligt, under respektive Försöksgrupp. Eventuella problem handläggs i samråd med veterinärerna vid Karolinska Institutet. Möss kan komma att föras över på andra godkända etiska tillstånd och kan i samband med detta byta djurhus

4 Försökets genomförande

Sammanställning av försöksgrupper och åtgärder inom dessa:

Försöksgrupp: Avel och gemensamma procedur

Undergrupp: Avel och gemensamma procedur

Djurart: Mus (*Mus musculus*)

Åtgärd 1: Avel och genotypning

Åtgärd 2: Plugg och vävnadsinsamling

Åtgärd 3: Blodprovstagning

Försöksgrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet

Undergrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet

Djurart: Mus (*Mus musculus*)

Åtgärd 1: Systemisk AAV

Åtgärd 2: Leverans av ämnen

Åtgärd 3: Sensoriska beteendetest och sensorisk stimulering

Åtgärd 4: Rutiner under kirurgiska ingrepp

Åtgärd 5: Spårningsämne leverans till centrala nervsystem

Åtgärd 6: Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande

Åtgärd 7: Centrala mekanismer: pågående stress

Åtgärd 8: Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet

Åtgärd 9: Centrala mekanismer: sömnbrist

Åtgärd 10: Den andra åtgärd av centrala mekanismer

Försöksgrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta

Undergrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta

Djurart: Mus (*Mus musculus*)

Åtgärd 1: Systemisk AAV

Åtgärd 2: Leverans av ämnen

Åtgärd 3: Sensoriska beteende test och sensorisk stimulering

Åtgärd 4: Rutiner under kirurgiska ingrepp

Åtgärd 5: Spårningsämne leverans till nervsystem

Åtgärd 6: Spårning av perifera nätverk

Åtgärd 7: Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande

Åtgärd 8: Centrala mekanismer: pågående stress

Åtgärd 9: Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet

Åtgärd 10: Centrala mekanismer: sömnbrist

Åtgärd 11: Smärta modell: Reumatoid artrit

Åtgärd 12: Smärta modell: Nervskada

4.1 Försöksgrupp: Avel och gemensamma procedur

I denna grupp beskriver vi avel och gemensamma procedur. Alla möss som används i efterkommande försöksgrupper nedan används också i denna grupp.

4.1.1 Undergrupp: Avel och gemensamma procedur

I denna grupp beskriver vi avel och gemensamma procedur. Alla möss som används i efterkommande försöksgrupper nedan används också i denna grupp.

Mus (*Mus musculus*), 14000 st, Försöksdjursanläggning

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

Vi behöver använda stammar som uttrycker region-specifika rekombinaser (t.ex. Cre, CreERT, Dre, DrePBD och Flp och deras varianter) och reporter gener (t.ex. GFP, CFP, YFP, BFP, RFP, TVA, DTA, DTR, 3chimeric, 4chimeric, Tomato, channelrhodopsin, halorhodopsin, archaerhodopsin, fungal opsins, DREADD (inklusive KORD) och andra) som drivs från följande gener eller deras promotorer: UHRF1, CAGG, Rosa26, Dhh, Dbh, Glast, GFAP, Shox2, Arf, TrkA, TrkB, TrkC, Ret, Th, Tbx1-3, Hmx1, Prox1, Prox2, Ret, Asc1, Mash, PLP, Sox, Sox2, Sox10, Nestin, fos, Arc, ATF, Runx1-3, Vglut1-3, H2AX, Mir, Wnt, CCK, TRH, Nts, Nmu, Nmur, Npff, Tac1, Tac2, Bax, Thr, Adra2a, Lmo3, Lmo2, TRAP, Lmo4, Meis2, Gal, Tacr1, Tacr2, Sst, Pvalb, Calb2, Npy, Npy1r, Npy1r2, Sstr1, Htr1a, Htr3a, Ztp276, Cpne4, Trhr, Trh, PDYN, Kcnip2, Avil, Piezo1, Piezo2, vGAT, vGlut2, Ztp276, Gfra1-3 och följande genfamiljer: Piezo, Shox, Sox, Tbx, Trpm, Trpv, Trpc, Trpa, Hoxb, Hoxc, Mrgpr and Lmx eller andra gener som märker upp specifika populationer av celler.

Eftersom alla de här stammarna är antingen reporter eller Cre djur så har dessa djur ingen avvikande fenotyp och det spelar således ingen roll från ett djuretiskt perspektiv vilken gen som används.

Vi kommer också att använda stammar med floxed (flankerad med lox, rox och/eller frt sites) av olika gener t.ex.: UHRF1, Dhh, Dbh, Glast, GFAP, Arf, TrkA, TrkB, TrkC, Ret, Th, Tbx1-3, Hmx1, Prox1, Prox2, Ret, Asc1, Mash, PLP, Sox, Sox2, Sox10, Nestin, fos, Arc, ATF, Runx1-3, Vglut1-3, H2AX, Mir, Wnt, CCK, TRH, Nts, Nmu, Nmur, Npff, Tac1, Tac2, Bax, Thr, Adra2a, Lmo3, Lmo2, TRAP, Lmo4, Meis2, Gal, Tacr1, Tacr2, Sst, Pvalb, Calb2, Npy, Npy1r, Npy1r2, Sstr1, Htr1a, Htr3a, Ztp276, Cpne4, Trhr, Trh, PDYN, Kcnip2, Avil, Piezo1, Piezo2, vGAT, vGlut2, Ztp276, Gfra1-3 och följande genfamiljer: Piezo, Shox, Sox, Tbx, Trpm, Trpv, Trpc, Trpa, Hoxb, Hoxc, Mrgpr and Lmx eller andra gener för neuropeptider, receptorer, transkriptionsfaktorer eller andra gener som iblandad i utveckling och förmedling känslighet inklusive smärta.

Vi kommer att behöva använda stammar med olika muterade alleler t.ex.: H2afxS139A, H2afxY142F, H2AX, H2AX+/-*CtvaInk4a-Arf-/-, Bax, Hmx1-LacZ, RC:PTOX, R9Shc, R9Dok, R9Frs, R9wt3g9 (R9wt), RetCreERT2, Tau-Stop-mGFP, TagRunx1, CtvaInk4a-Arf-/-, Tau (StopTau mGFP) och gener för neuropeptider, receptorer, transkriptionsfaktorer eller andra gener som iblandad i utveckling och förmedling känslighet inklusive smärta.

Vi kommer att behöva använda korsningar mellan ovan nämnda musstammar. Ingen av dessa stammar och korsningar förväntas ha avvikande fenotyp. Om avvikande fenotyp över 0,3p enligt KI-mallen upptäcks under korsning kommer vi att ansöka om tillägg.

Vi behöver också använda olika skildtypstammar som tex: C57bl6, Sv129, Swiss, CD1, nod-scid, scid, nod, BALB/C, CBA, C3H, DBA, ICR, FVB och Swiss och dessa understammar (substrains).

Spontan blindhet hos Rosa26-Tomato stammen:

Vi har observerat att en del djur som bär på R26-Tomato allelen blir blinda på ett eller båda ögonen. Det finns ingen antydning om inflammation. Ingen infektion har detekterats i dessa djur. Vi tror att denna fenotyp är ett resultat av att djuren är inavlade och skulle vilja använda sådana djur i försöken samt att de är på C57Bl/6J bakgrund vilket har en spontan tendens att inte ha ögon. Detta skulle göra att vi kan minska aveln och antalet djur i varje försök.

Vildtypsstammar med fenotyp: C3H

C3H (och dess substammar) är standardstammen för smärtmodeller vid cancersmärta. Några av dessa stammar genererar blindhet med tiden (runt avvänjningstiden). Denna stam kan utveckla hepatom när de är äldre än 12 månader. Trots avsaknaden av exogena musbrösttumörvirus (MMTV), kan honor fortfarande utveckla juvertumörer senare i livet (när äldre än 12 månader). Vi kommer inte använda djur för studien som är äldre än 12 månader. Avbrytningspunkt för djur i avel och som ännu inte ingått i försök är 0,4 enligt KI-mallen, vi kommer att avliva djur som utvecklar juvertumörer.

Genetiskt modifierade djur används: Ja

Diarienummer på tillstånd samt beskrivning och motivering av metoder.

Vi kommer inte att generera helt nya GMO stammar under detta tillstånd, skulle ny stam tas fram sker detta under kommersiellt företag eller core facilitets etiska tillstånd tex KCTT vid KI.

Vi använder befintliga GMO stammar för avel samt korsningar mellan dessa.

Dnr för GMO är:

KMW: 5.5.18-14683/18

KMB: 5.5.18-12320/17

KMA: 5.5.18-123221/17

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

Åtgärd 1: Avel och genotypning

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Hona och hane sätts samman för avel. 1-2 honor per hane. Om två honor i samma bur blir dräktiga ungefär samtidigt, separeras honorna från varandra ca 1 vecka före beräknad födsel.

Flera av våra musstammar avlas som heterozygota linjer och måste genotypas. För detta kommer örönbitar som blir över från ID-märkningen att användas i möjligast mån och detta görs vid avvänjningen, dvs ca 3 veckors ålder, för att undvika att störa djuren mer än nödvändigt. Skulle inte genotypningen fungera tas en ny örönbiopsi i första hand och i sista hand den yttersta millimetern av svanstippen.

I vissa fall behöver vi ta biopsier från (och markera) unga djur (P0-P14). Detta görs i samråd med veterinär med lämpliga metoder t.ex. örönbiopsi/svansbiopsi i kombination med tatuering alt. tåpetsbiopsi. Tåpetsbiopsi (fr.o.m P4) utförs som ca 0.5 mm lång biopsi av en tå (position varierar mellan djur), denna spets använd också för genotypning.

Djuren kommer att ha gruppållning efter behandling om det inte uppstår särskilda skäl för ensamållning såsom t.ex. efter kirurgi eller vid beteendeförsök, se under respektive grupp. Endast om nödvändigt för försöksresultaten kommer djuren att ensamållas. Det kan behövas framför allt för hanar som annars kan skada varandra. Det längsta ett djur ensamålls är lika med den längsta tiden för specifikt försök. Vi kommer dock att i största möjliga mån undvika ensamållning.

Vid ev. födsels komplikationer (t.ex. kan uppstå vid TAM injektion) kan kejsarsnitt används: dräktiga honan sövas med isofluran embryonal dag (E)17-E21 i dräktigheten, fostren opereras ut och placeras hos en fostermamma. Den kejsarsnittade honan avlivs.

Vi kan komma att behöva producera nya musstammar i KI core facility alt. hos andra leverantörer av musstammar. Vi förväntar oss ingen avvikande fenotyp hos dessa möss. I det fall vi känner till avvikande fenotyp eller upptäcker avvikande fenotyp över 0.3p enligt KI-mallen ansöker vi om tillägg till denna ansökan för denna musstam.

Eventuell påverkan på djuren:

Biopsiering kan orsaka snabbt övergående smärta och liten stress på djuret. Vi förväntar oss inte att avel av våra stammar eller korsningar mellan stammar kommer att orsaka ett öka lidande hos djuren. Det kan i sällsynta fall förekomma komplikationer vid födseln.

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

För att upprätthålla genmodifierade stammar krävs avel och genotypning. Biopsi från unga djur kommer att behövas i vissa situationer, såsom t.ex om ungar med specifik genotyp behöver injiceras med t.ex. tamoxifen (TAM, se Åtgärd 3 för beskrivning) eller om prover av levande celler eller liknande behövs från ungar med rätt genotyp.

Genotypning av ungar kommer att behövas i vissa situationer, såsom t.ex om ungar med specifik genotyp behöver injiceras med t.ex. tamoxifen eller om prover av levande celler eller liknande behövs från ungar med rätt genotyp.

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

Öronbiten (och ev. svans- eller tåspetsbiten för unga) som blir över från id-märkningen hos djuret används i största möjligaste mån.

Åtgärd 2: Plugg och vävnadsinsamling

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

1-2 honor sätts samman med en hane. Dagen efter pluggkontrolleras honan genom att undersöka honans vagina (icke-invasivt).

Embryon och ungar avlivas därefter vid olika utvecklingsstadier, som embryoner eller postnatale (upp till dag 21), och olika vävnaden studeras genom in vitro metoder.

För att kunna tidsbestämma åldern hos embryonen måste vi parplugga honan.

Detta är viktigt då vi studerar olika utvecklingsstadier under perifera nervsystemet (PNS) tidiga utveckling. Vi vill även kunna studera vävnad från vuxna djur.

Den dräktiga honan kan behandlas med tamoxifen och/eller BrdU och liknade (se under respektive åtgärd, "Leverans av ämnen" i nästa försöksgrupp). Vävnad kan även komma att insamlas post mortem från vuxna djur som ej använts för plugg.

Eventuell påverkan på djuren:

Vi förväntar oss inga stora negativa effekter på djuren utan lite stress från ev. injektion.

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

För att kunna tidsbestämma åldern hos embryonen måste vi parplugga honan. Detta är viktigt då vi studerar olika utvecklingsstadier under djur tidiga utveckling och vi vill även kunna studera vävnad hos vuxna djur varför vi vill kunna ta vävnad även från dessa.

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

Berikning och daglig tillsyn.

Åtgärd 3: Blodprovstagning

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi kommer att behöva ta venöst blod (från svansen, vena saphena (lateral saphenous vein) eller andra vener enligt etablerade metoder godkändas av KI's veterinärer. Max prov volym är 140 µl per djur/dygn, minimalt intervall mellan provtagning - 3 dygn, max 10 gånger per djur, max total volym under två veckor period - 7 ml per kg av djurvikt (dvs max 10% av cirkulerande blodvolym under två veckor).

Maximalt i.v.(åtgärd "Leverans av ämnen" i alla försöksgrupp nedan) + venös blodtagning blir aldrig fler än 15 gånger per djur, av dessa är max 7 i.v.¶

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

Proven är nödvändiga för att kunna få information om hematologiska och kemisk blod status, och kemiska förändringar under behandling med substanser för att kunna följa substansens nedbrytning/upptag.

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

Blodprovstagningen sker via kanyl eller prickning av ven med skalpell utan snitt. Detta för att minimera påverkan hos djuret.

4.1.1.2 Svårhetsgrad och avbrytningspunkt

Svårhetsgrad: Måttlig

Beskrivning av avbrytningspunkten

Djur som inte ingår i försök: 0.4 (KIs bedömningsmall). Om fenotypen som uppstår når 0.4 avslutar vi aveln och kommer in med en tilläggsansökan. Avbrytningspunkten för djur i studie är beskriven under specifik undergrupp.

4.1.1.3 Efter försöket

Avlivningsmetod: Halsdislokation

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

Djuret hålls i svansen och nacken fixeras. En snabb ryck i svansen utförs som bryter djurets nacke. Proceduren utförs i både bedövade och vakna djur.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Avblodning av medvetslösa djur

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

Djuren är satt under narkos, thorax öppnas och hjärtat är exponerat. systemet töms på blod genom injicering i hjärtat av PBS buffert (eller liknade). Efter det injiceras fixeringslösning (t.ex 4% PFA i PBS), annan eller annan lösning om ofixerad vävnad är önskad.

Bedövningsmetod

Narkosmedel

Beskrivning av bedövningsmetoden

Isofluran (3-5%) eller injektionsanestesi (medetomidin+ketamin, xylazin+ketamin eller pentobarbital).

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Avblodning

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Koldioxid

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

Djuren placeras i en genomskinlig bur. Koldioxidhalten höjs därefter successivt.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Kontroll att cirkulationen har upphört
- Kontroll att rigor mortis har inträtt
- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

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.

Några djur ska också skickas till våra kollegor i EU, framför allt Tyskland. De har unik metod för att mäta egenskaper av individuella nervändar i hud (utföras på vävnadsexplantat). Vi skickar levande mus efter veterinärs har bekräftat djurens bra kondition och hälsa. Vi kommer behöva skicka mindre än 5% av våra experimentella djur till kollegor i EU. Mottagarna i EU har försöksdjuretiskt tillstånd i enlighet med nationella lagstiftning. Djur utsätts till måttlig stress under transport vilket ska hållas kort.

Djuren ingår i andra grupper i denna ansökan

Beskrivning av vilken/vilka övriga grupper djuren kommer att ingå i.

Djur i denna grupp ingår också i alla försöksgrupp nedan.

4.2 Försöksgrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet

4.2.1 Undergrupp: Centrala mekanismer i normal känslighet

I denna grupp beskriver vi procedurer och experimentflöden för att studera hur specifika nervceller populationer i hjärnan modulerar normal känslighet. För att kunna selektivt manipulera neuroner i hjärnan som aktiveras av olika djurupplevelse (som t.ex. fysisk aktivitet, kronisk stress eller opioidabstinens), måste vi utsätta djur för dessa upplevelser. Detta viktiga steg behövs för s.k. genetisk spårning som antingen märker sådana celler eller gör dem mottagliga för funktionell modulering (till exempel inaktivering).

Angiven siffra är en uppskattning och kan komma att ändras något.

Mus (*Mus musculus*), 2500 st, Försöksdjursanläggning

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

Se Försöksgrupp Avel, 4.1.1, beskrivning av ras.

Djur som används i denna undergrupp är en del av djuren i försöksgrupp 4.1.

Max ensamhållning för detta grupp 3 månader.

All tillsyn beskrivas i åtgärder i denna grupp är extra tillsyn som vanligtvis utförs av forskarna.

Genetiskt modifierade djur används: Ja

Diarienummer på tillstånd samt beskrivning och motivering av metoder.

se försöksgrupp 1

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

Åtgärd 1: Systemisk AAV

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Denna åtgärd används i denna försöksgrupp samt i alla försöksgrupper nedan.

Vi behöver använda systemisk administrering av Adeno-associated virus (AAV), som visat sig vara effektiv för uttryck av gener i det centrala och perifera nervsystemet, inklusive sensoriska neuroner av dorsal rots gangliet (DRG).

Ämnena i sig leder inte till förändring i djurens hälsa.

Djuren kan sövas (isofluran eller i.p.-injektion av ketamin/xylazin om isofluran inte är tillgänglig, eller annat rekommenderat av veterinär). Vi levererar AAV systemiskt till vuxna möss (iv: svans, temporal eller annan ven, max 200 ul. Volymen som överstiger 125 ul (d.v.s. mellan 125 och 200 ul) injiceras långsamt, som en infusion) eller neonatala möss (P0-P3; i.p: max 50 ul). De injicerade nyfödda returneras till sina biologiska mödrar eller fostermödrar när de har återhämtat sig helt.

Denna åtgärd har måttlig svårighetsgrad och kan utföras max en gång per djur.

Djur kommer att uppleva besvär i samband med injektionen. Virus orsakar inga symptom. När ungarna förflyttas från buren kommer modern att uppleva stress.

Fostermödrar kan behövas för att fostra ungar efter AAV injektion om mamma vägrar att ta hand om injicerade ungar (detta har dock aldrig tidigare hänt i flera dussintals kullar som behandlas på detta sätt i labbet). I detta fall kommer avel av djur som tillhör stammar som tar bra hand om ungar (ICR, FVB eller liknande) ordnas i god tid.

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

Vi studerar rollen av specifika gener involverade i smärtmekanismer. För detta behöver vi modifiera uttryck av de specifika gener eller introducera gener som gör att man kan styra aktiviteten hos neuron.

Systemisk AAV-infektion är enkel, effektiv och den minst invasiva metoden för att göra detta.

Vi behöver utföra i.p till ungar från P1 eftersom AAV infektion av perifera nervsystem kan nås med andra administrering t.ex via mamman. Vi har sådan erfarenhet i labbet.

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

För vuxna djur appliceras smärtstillande kräm på svansen 15-30 minuter före i.v. När ungarna förflyttas från buren kommer modern att uppleva stress. För att minimera denna effekt, behandlas endast max hälften av ungarna åt gången och resterande är kvar i boet. Efter att den första uppsättningen av injektioner är klar, sätts de injicerade nyfödda ungarna tillbaka i buren och de återstående ungarna överförs till värmeplattan för AAV administration.

Åtgärd 2: Leverans av ämnen

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi behöver leverera olika ämnen med, bl.a. följande syfte: i) aktivera specifik rekombination eller specifikt genuttryck; ii) i samband med sensoriska test modifiera olika signalvägar för att studera hur de bidrar till sensorisk känslighet (agonister och antagonister); iii) utföra kronisk modifiering av olika signalvägar för att studera hur de bidrar till sensorisk känslighet på lång sikt.

Under hela experimentet utförs maximalt 35 injektioner för varje enskilt djur, varav max: 20 st i.p (max volym 0.5 ml per injektion), 25 st p.o. (max volym 10 ml/kg, dvs 0.25 ml per injektion för 25 g mus), 25 s.c. (max volym 0.25 ml), 3 intratekal (i.t., max volym 5 ul per injektion, utförs under anestesi) och

två intraplantar (i.pl: max ett injektion per tas/djur, maxvolym är 20 ul. Utförs under anestesi).
i.p., p.o., s.c- max en injektion per dag. i.t – min 3 dag intervall , i.pl. – min 7 dag intervall. I.p. kan ges till dräktiga honor t.o.m. E14. I möjligaste mån använder vi dock s.c eller p.o.

Om det anses lämpligt kan serier av injektioner ovan ersättas med en miniosmotisk pump installation (i.v. eller intracerebral; Alzet eller liknande) . Detta ingrepp är enkelt, utförs under narkos och orsakar mindre obehag för djuret.

Efter högst 30 dagars infusion kommer djuren att sövas, pumparna tas ut och huden sutureras med hjälp av sterila silkesuturer (eller alternativ). Om en minipump installation utförs i en lämplig situation kan det både förbättra djurets situation och resultatet av experimentet. Bara maximalt en minipump installation utförs per djur. Djuren ges smärtlindring under/efter minipump operationen. Istället för minipump andra metoder användas som tillåter långvarig ämnesfrigöring.

Ämne som vi kommer behöva att injicera:

Clozapine-N-oxide (CNO, max dos 0.3 mg/kg, i.p.), Clozapine (max 0,05 mg/kg, i.p), salvinorin B (DREADD ligand/DMSO/s.c. 10mg/kg), diphtheria toxin (DTX, max 200 ug/kg, i.p.) och andra ligander till DREADD och andra jonkanaler/proteiner. Syntetiska proteiner har designats för att kunna aktiveras av dessa ämnen eftersom de inte har någon bieffekt eller toxisk effekt vid de använda koncentrationerna. Deras specifika effekter på de syntetiska proteinerna är att öka/minska aktiviteten hos neuron, dvs modulerar sensorisk känslighet.

Gabapentin (i.p. 100mg/kg or for i.t. 200ug/10ul per djur), agonister och antagonister för NMDA- och GABA-receptorer (dosen bestäms i samråd med veterinären baserat på publicerade protokoll), stryknin (glycin receptor antagonist , max 2 mg/kg, i.t.), bicuculin (GABA-A antagonist, i.p., 70 ug/injektion, i.t. 8 ug/injektion). Dessa ämnen förväntas inte ge upphov till biverkningar eller toxiska effekter utan modulerar sensorisk känslighet.

Neuropeptider (tex substance P, galanin, somatostatin, endorfin, CGRP, neuropeptide Y, 20 nmol/kg, dvs ca 0.75nmol/injektion, eller 40 ug i.pl/i.t) och antikroppar, receptorer och antisense till dessa (30 mg/kg dvs ca 1 mg/injektion; 30 ug i.t). Dessa ämnen modulerar neuropeptidsignalering och förväntas ha specifika korttidseffekter (under några timmar) på känslighet för sensoriska stimuli. Neurotrofiner (tex NGF, BDNF och GDNF, 17 ug/injektion, i.pl , i.p, i.t, s.c), receptorer till neurotrofiner, neutraliserande antikroppar till neurotrofiner (20mg/kg, 20 ug för i.t.) antisens till neurotrofiner och neurotrophin receptorer (50 pmol/injektion, i.t.), inhibitorer av neurotrofin receptorer (100 mg/kg, 70 ug i.t.). Dessa ämnen förväntas kunna påverka känslighet till olika typer av stimuli. Förväntad längd på effekten varierar beroende på koncentration och administration. Inga biverkningar eller toxicitet är förväntade.

Cytokiner (inklusive interleukin 1 beta, TNF, 5mg/injektion, i.pl/i.t), interleukiner (inklusive IL1b,IL10, IL4, IL6, IL20; 25 mg/kg, i.pl; 50 ug i.t), chemokines (inklusive CCL2), prostaglandiner (20ng/injektion, i.t) ; inhibitorer av prostaglandin syntes (60 mg/kg, 25 ug i.t), ATP (100 nmol/injektion, i.pl), bradykininer (4 nmol/injektion, i.pl). Dessa ämnen förväntas inte ge upphov till biverkningar eller toxiska effekter utan modulerar inflammatoriska komponenter som påverkar sensorisk känslighet och kan hjälpa att förstå hur olika signalvägar bidrar till känslighet genom rekrytering av olika celltyper.

Ketorolac (NSAID/ saline/ i.p. 20mg/kg, 10 ug i.t); Ibuprofen (saline/ i.p. 20mg/kg, 10 ug i.t); morfin (sc/ip, max 10 mg/kg, max 3 ggr per dag max 2 dagar), naloxone (opioid agonist, max 20mg/kg, ip, 10 ug i.t), Diclofenac (NSAID/saline/i.p. 30mg/kg, 10 ug i.t); naproxen (NSAID/saline/i.p. 30mg/kg, 10 ug i.t); etanercept (TNF blocker/saline/s.c./ 10mg/kg). Dessa ämnen används i människa. Vi förväntar oss därför bara specifika effekter på sensorisk känslighet utan bieffekter eller toxicitet.

Vi kommer att behöva leverera agonister eller antagonister för receptorer utan känd ligand av GPCR-klass, som uttrycks i nociceptorer eller andra nervceller av "känslighets nätverket".

Pyrrolidinditiokarbamat (PDTC) eller liknande kandidatagonist ska levereras ip eller sc med max koncentration är 100 mg/kg för max 15 injektioner med minst 2 dagars intervall. Andra ämnen med samma syfte och förväntade egenskaper kan användas också. Eftersom dessa receptorer uttryckes i selektiva nervcellspopulationer, blir påverkan av djur begränsad till studerad just dom cellernas funktion.

Proliferations analyser

För att markera celler som delar sig behöver vi injicera möss med BrdU (50mg/kg kroppsvikt), EdU

eller liknande i maximalt 500 ul koksaltlösning i.p. För att få en bild av celldelningen under en längre tid kommer mössen att injiceras dagligen i maximalt 7 dagar.

I vissa fall för att aktivera syntetiska gener, deras produkter eller endogena produkter kommer vi att administrera till djur specifika ämnen, inklusive:

Tamoxifen (TAM, 140 mg/kg dvs ca 4 mg/injektion, i.p, p.o.), 4OH-tamoxifen (max 100 mg/kg, dvs ca 3 mg/injektion, i.p, s.c, p.o.), doxycycline (p.o. som gavage eller med dricksvatten), Ru486 (Mifipriston, max 20mg/kg, dvs ca 0.5 mg/injektion; i.p, s.c, p.o.) eller andra ämnen som inte har någon systemisk påverkan på djuren. Ämne administreras (max 6 ggr/djur, max 1 gång per dygn) genom oral gavage (sondmatas), intraperitoneal (ip) injektion på dräktiga honor, vuxna djur, i sällsynta fall då rekombinationen inte är fullständig kan behandling komma att behöva upprepas åtminstone en vecka senare. TAM ges som max 12 leveranser. Andra ämne (för aktivera syntetiska gener) ges som max 5 injektion. Unga möss (födelse till och med 3 veckor) kommer att i. p injiceras istället (fr.o.m P5, max. 20 ml/kg), men vid möjlighet kommer lakterande honor sondmatas med TAM i syftet att överföra substansen till ungarna via mjölken. I detta fall görs högst fem (5) sondmatningar per laktations tillfälle/kull. TAM lösas upp i korn/majs olja eller liknade (10-20 mg/ml). Både hård och mjuk sond kan komma att användas för beroende på stam och vad den som utför administrationen är upplärd på.

Dessa ämnen används ofta i smärta/neurovetenskapliga studier i möss och de orsakar ingen biverkning/toxisk effekt. Således, det är injektion själva som påverkar djur mest. Administrering av tamoxifen till dräktiga honor kan leda till förlossningskomplikationer . I ett sådant fall tas fostren ut genom kejsarsnitt och de nyfödda flyttas till fostermodern.

Sammanlagt antal injektion ger olika klassificering av svårighetsgrad:

i.p., s.c, p.o.: 1-7 injektioner – milda , 8-35 injektioner – måttlig; i.t: 1-3 injektioner måttlig. Djur kommer att uppleva mindre stress och obehag i samband med administrering av ämnena.

Syntetiska gener/promotorer har designats för att regleras av vissa av dessa ämnen men ämnena ska inte påverka resten av genomet eller leda till påverkan på djuret.

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

Kontroll av genuttryck med syntetiska ämnen är en av de mest kraftfulla metoder att studera funktionen av olika gener och celltyper för kroppens fysiologi och patofysiologi, inkluderande kronisk smärta.

Leverans av aktivering/hämning ämne utförs för att studera roller av signalvägar i olika smärtmekanismer.

Injicering i tassen (i.pl) behövs för att studera lokala mekanismer i tassen inkl. signalering mellan cellerna som kontrollerar känslighet i huden.

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

Proceduren utförs av utbildad personal. Den minst invasiva metoden för administrering som tillåter att målet för experimentet uppfylls kommer att användas. När upprepade i.p och s.c. injektioner utförs varierar injektionsplatsen på samma djur för att undvika inflammation/irritation. I.t. injektion utförs under narkos.

Om ip administrering sker upprepade gånger så palperas buken före varje administrering. Möss med peritonit avlivas.

Åtgärd 3: Sensoriska beteendetest och sensorisk stimulering

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

För att undersöka hur olika åtgärder (ändring av genuttryck, sjukdom modell osv) ändrar känslighet kommer olika sensoriska test att utföras. Maximalt totalt sensoriska test (från ett set av olika test, se

nedan) per djur som kan utföras varierar mellan försöksgrupp. För denna grupp utförs maximalt 45 test per djur med maximalt 5 test per djur/dag (i max 10% av djur 6 test kan utföras per dag, max 2 sådana dagar, se nedan). Maximalt kommer sensoriska test att utföras under 10 dagar för denna försöksgrupp. Djuren kommer maximalt att vara i experiment för att testa sensorisk känslighet under 9 timmar per dag, inklusive habituering. Den största tiden under försöket kommer djuret att vänta på sin tur att testas. Vid några dagar (maximalt tre för varje djur) kan kombinationer av sensoriska test att ersättas med en sensorisk stimulering som ofta är en starkare aktivering av sensoriska nervsystemet än att bara mäta sensorisk känslighet. Sensorisk stimulering är en applicering av en specifik stimulus. Sensoriska stimuleringar kombineras aldrig med varandra eller känslighetstest under samma dag. Under maximalt två dagar kommer sensoriska test kombineras med administrering av ämnen som styr genuttryck eller kontrollerar receptor aktivitet. Ämnen administreras maximalt 2 gånger genom injektion systemiskt eller lokalt till området för sensorisk stimulation. Detta kommer att klargöra hur olika signalvägar påverkar känslighet för olika typer av känsel (tex värme, kyla och mekanisk känslighet). Vid de två dagarna som ämnen administreras kan maximalt 6 sensoriska test utföras istället för 5. Typiska test inkluderar 3 test innan och tre test efter att ämnet administrerats. Mindre än 10% djur kan ha en eller två dagar med 6 test per dag.

Hur testerna kan kombineras med varandra – se under testerna beskrivning nedan.

Den totala tiden djuret är i experiment är oförändrat och är maximalt 6 timmar under en dag.

Varje sensorisk test/stimulering nedan kan komma att kombineras med optogenetisk stimulering (LED-ljus). Sådan LED-ljusexponering kan appliceras antingen samtidigt med testning/stimulering eller före detta (maximalt i 60 minuter). LED-belysning levereras direkt från handhållna LED-lampor, via optisk fiber, alt kan LED-belysning tillhandahållas genom att placera musen på "DISCO-golv" (se plats preferens test nedan).

Långvarig ljusstimulering kan appliceras på antingen vaket eller sövt djur under högst 1 timme (det totala antalet anestesier per djur är 5). Ljus exponering innan sensorisk test (bl.a på sövda djur) utförs för aktivering archaerhodopsin med syfte att hyperpolarisera cellmembranet. Detta minskar nervcellers aktivitet och effekten fortsätta efter LED exponering upphört, även när sensorisk test utförs på djur efter de vaknar.

När LED ljus kombineras med sensoriska test, använder vi ljus med så låg effekt ljuset självt (ensamt) inte har någon effekt på musen (baserat på beteende). I några situation kommer vi appliceras bara ljus (utan sensorisk test) med höge effekt. Sådan ljus har liknande effekt på djur som sensorisk test. Nedan beskrivs de olika sensoriska testen (motiveringen för klassificeringen av svårighetsgraden för olika sensoriska test ges nedan under beskrivning av hur djuret kommer att påverkas av åtgärden).

1. Kemisk känslighetstestning (svårighetsgrad: avsevärd).

Vi behöver mäta känslighet för kemisk utlösande stimulus (inklusive smärta (akut och inflammatorisk) och klåda). Mössen hålls i plast-/glascylindrar på nätgolv mellan 30 min och 1 timme för habituering. Därefter injiceras önskad lösning i huden. Oftast blir det intraplantar (i.pl, d.v.s in i trampdyna, maxvolym 25 ul) men kan också vara s.c och i.d. (känslutlösande ämne; s.c (maxvolym 250 ul), i.d (maxvolym 5 ul), en injektion per tillfälle). Djuret är sövt maximalt 10 minuter under i.pl/i.d. injektionen och därefter mäts djurets beteende som svar på ämnet. Vid mätning av beteende placeras djuren i en plast-/glascylinder på nätgolv/glas för observation. Således vaknar djuret direkt på arenan (om observationen utförs omedelbart, till exempel efter injektion av capsaicin eller formalin) eller sätts tillbaka till buren för att återhämta sig för senare observation (till exempel efter injektion av karragenan). Varaktigheten och karaktären av reaktionen (lyfta, skaka och slicka på tassan etc.) registreras under en maximal period av 90 min (efter ämne injektion).

Maximalt behöver vi göra 3 kemiska stimuleringar per djur (max 2 av dem som i.pl, alltid på olika plats och olika tillfälle). Om i samma område på huden – maximal 1 per djur.

Känslutlösande ämne:

2,5 % lösning av karragenan (i 0,9 % saltlösning / PBS); 6% senapsolja, nervtillväxtfaktor (eller andra substanser som aktiverar sensoriska neuron lokalt i huden enligt internationella rapporter), formalin (upp till 4%), 0,5 mg/ml kapsaicin, 0,8 mg/ml mentol, cinnamaldehyd, klådstimulerande substanser (inklusive PAR2 mot 48/80, klorokin, klarakinin, serotonin (5HT)), 3 mg/ml icilin eller liknande.

2. Plats preferens (ringa/måttlig)

I "place preference" test kommer djuret att placeras i en arena som består av två lådor (ca 15 x 15 cm) anslutna till varandra. I varje låda kan golvet eller/och väggar belysas utifrån med ett starkt ljus av olika

våglängd (ett "DISCO-golv"). Detta aktiverar eller stänger av neuronal aktivitet hos specifika nervcellspopulationer som uttrycker ljuskänsliga proteiner (s.k. optogenetisk stimulering). Dessutom kommer golvet i den ena lådan (lådan 1), fixeras mellan -0oC och + 52oC (som känns "obehaglig"), medan golvet i den andra lådan (lådan 2), kommer behållas i mer behaglig temperatur. I dom flesta fall är det mellan +15oC och +35oC (djur har minimala preferenser inom detta temperaturintervall under utforskning fas dvs första 15-20 min på stor arena). I några fall dock måste temperaturen av golvet i lådan 2 sättas på mindre behaglig temperatur. Denna temperatur definieras som temperatur där djur dröjer sig kvar åtminstone 20% av tid i jämförelse med vanligt behagliga temperaturen (mellan +15oC och +35oC). Sådan experiment krävs för att uppnå specifik vetenskapligt data, till exempel för att studera om specifik cell grupp är inblandad vid diskriminering mellan t.ex 10oC och 5oC eller 37oC och 40oC . I början av experimentet kommer musen placeras på golvet med mer behagliga temperaturen.

Arenan kommer att övervakas (manuellt eller via automatiserat videosystem), och djurens fria förflyttning mellan lådorna spåras. Varje experiment tar inte mer än 30 minuter per djur. Djur kommer att habitueras för begränsning i maximalt 5 dagar (behöver inte vara i följd) i upp till 30 min varje dag. Tröskel-tiden för djur att stanna kontinuerligt på obehagsplattformen är lika mycket som 5 gånger maximal observerad uppehållstid för kontroldjur (av samma stam/genetisk bakgrund) för denna temperatur. Detta sensoriska test kan komma att kombineras med kemisk känslighetstest (ovan).

Samma försök som beskrives ovan kan komma att utföras användande golvunderlag med olika textur eller objekt med olika form/textur/material. Denna testvariant är ringa.

Samma försök som beskrivet ovan kan komma att utföras användande substanser (se ovan) istället för ljus. I dessa fall injiceras känslutlösande ämne enligt ovan i en av de två lådorna en gång per dag i två dagar och därefter spåras vid senare dagar djurens förflyttning mellan lådorna. I det fall ämnen orsaka obehag kan detta mätas genom att djuret väljer att vistas i den andra lådan där dom inte har fått substans. Denna testvariant är måttlig.

3. Randall-Selitto Paw Pressure test (måttlig)

Vi behöver använda Randall-Selitto Paw Pressure test (IITC Life Science, CA, USA). Detta etablerade beteendetest används för att mäta mekanisk nociceptionströskel. Under tillvänjningen placeras musen i en fixerande sele under max 15 min/dag i maximalt 5 dagar innan test utförs. Testet består av applicering av en gradvis ökande mekanisk kraft till baktassen av det fasthållna djuret med användning av en Randall-Selitto sond tills sensationen når en nivå som utlöser tillbakadragande av tassens och kraftnivån registreras. Sonden (typ, stor pincett) kopplas till en digital kraftgivare för att få värdet på kraftpåverkan. Upp till 8 separata mätningar (omväxlande; max 4 per tass ges till de båda baktassarna) kommer att appliceras med 1 till 10 min intervall och den genomsnittliga maximala intensiteten av trycket definieras som medeltröskelvärde. Testet kan komma utföras också på djur som är fasthållna via enhandsgrepp om rygghuden. Totala tiden för en testomgång överstiger inte 60 minuter (vanligt blir 40 eller lite mindre). För att undvika vävnadsskador appliceras aldrig krafter över 600 g (5.9 N). Denna applikation kan också upprepas mellan 9 och 24 gånger (med 1-5 min intervall per djur och 2-10 min intervall per tass; inte mer än 12 per tass, total maximal tid av stimulering inkl. intervall - 1.5 h). Ett sådant experiment klassificeras som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med någon annat test eller stimulering under dag.

4. Pressure Application Measurement (PAM; måttlig)

Detta beteendetest används för att mäta den statiska mekaniska smärtröskeln för ben och leder. Djuret fixeras via försiktigt fasthållen via enhandsgrepp om rygghuden. Testet består av applicering av en gradvis ökande mekanisk kraft till knä/ben med hjälp av en PAM sond (Ugo Basile, Italy) tills sensationen når en nivå som utlöser tillbakadragande av benet och kraftnivån registreras. Sonden kopplas till en digital kraftgivare för att få värdet på kraftpåverkan. Vi behöver göra maximalt fyra separata mätningar (två per ben) med 1 till 10 min intervall och den genomsnittliga maximala intensiteten av trycket definieras som medeltröskelvärde. Total tid för en sessionstestning överstiger inte 35 minuter. Ingen kraft över 700 gram kommer att appliceras, för att undvika vävnadsskador. PAM har högre max tröskelvärde än Randall-Selitto eftersom stimuli appliceras till ben/knä och inte tass.

5. Radiant heat (inklusive Hargreaves test; mild)

För detta test placeras mössen ovanpå en glasyta eller ett trådnät och får 20-60 minuter för habituering. Radiant heat apparaten hålls för att fokusera ljusstråle på en tass, svansen eller annan hud. Stimuleringen avlägsnas när en tillbakadragning av tassens sker (alt. svansen eller annat beteende om stråle riktades till annat hudområde) observeras och reaktionstiden registreras. Om ingen tillbakadragning av tassens observeras kommer enheten att tas bort efter maximalt 20 sekunder för att undvika vävnadsskador. Denna stimulering kommer att ges maximalt 5 gånger för varje tass (hud område) med 1-10 minuters intervall (maximalt totalt 10 värme appliceringar per djur/5 per tass /1 timme per djur (om utförs som separat test).

Denna applikation kan också användas för sensorisk stimulering och upprepas i de fallen mellan 11 och 30 gånger (tidsintervall 1-10 min mellan applikationer, inte mer än 30 per tass, total maximal tid av stimulering inkl. intervall - 2.5 h). Ett sådant experiment klassificeras således som sensorisk stimulering, inte som sensorisk test och kommer inte att kombineras med någon annat test eller stimulering under dag.

6. Icke smärtsamt aceton test (mild)

Stimuleringsparametrarna (temperaturen som huden når) i detta test är inte helt kontrollerade. Trots det används detta test i de flesta studier för kylkänslighet och därför är det viktigt att vi utför det testet också för att jämföra våra resultat med tidigare resultat.

Vi behöver detta test för undersöka känslighet för kyla. Mössen kommer att placeras ovanpå ett trådnät och tillåtas habituering under max 60 minuter innan testet påbörjas. En droppe av aceton appliceras försiktigt till baktassen från en 1 ml spruta (direkt eller med hjälp av ett polyetenrör ovanpå en 23G nål). Varaktigheten och karaktären av reaktionen (lyfta, skaka och slicka på tassens) registreras under 1 min. Varje test består av maximalt 10 repetitioner (applicering av droppen, vanligtvis 6 repetitioner, 3 per tass), växelvis mellan båda tassarna med 1-10 minuters intervall. Total maximal test tid är 4 h (inkl. habituering).

Denna applikation kan också upprepas mellan 11 och 50 gånger (med samma tidsintervall, inte mer än 30 per tass, totalt maximal tid för stimulering inkl. intervall - 1.5 h). Ett sådant experiment klassificeras som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

7. Openfield (ringa)

Vi behöver använda "open field"-liknande test som innebär observation och registrering av oprovocerat beteende av fritt rörliga möss i "open field" arena, CatWalk (Noldus Inc.) eller liknande. Upp till tre objekt (av olika form/textur/material) kan finnas på arenan för att registrera hur musen interagerar med dem. Bara objekt som inte förväntas ha någon negativ påverkan på djuren kan användas. Musen kan observeras av en forskare, filmas, alt rörelse & annat beteende registreras av video trackning, infraröd-, elektrisk kapacitet, registrering eller annat icke-invasivt system. Maximalt: 60 min habituation plus en 30 min observationstid. Maximalt tre olika varianter av detta test kan utföras under en dag på samma djur. Då olika arenor används och varje variant räknas som ett separat test.

8. Pinprick (mild)

Detta test används som ett av standard neurologiska testen för att utvärdera känslighet hos människa. En nål (23-30G) appliceras försiktigt till den plantara ytan av baktassen (utan att penetrera huden) på en mus som sitter på ett galler och kan röra sig fritt. Ett svar definieras som att musen lyfter, skakar eller slickar baktassen, Max totalt 14 st applikationer (med 5-15 min intervall) appliceras till ena eller båda baktassarna (omväxlande; max 7 nålappliceringar per tass ges till de båda baktassarna). En experimentserie utförs per dygn som tar max 2 timmar (max totalt 14 st nålappliceringar per djur/7 per tass) alt 2 serier av max 1.5 timme per serie (max totalt per dygn per djur: 3 timmar/22 nålappliceringar /11 per tass).

Denna applikation kan också upprepas mellan 23 och 46 gånger (med samma tidsintervall, inte mer än 22 per tass, totalt maximal tid av stimulering inkl. intervall - 1.5 h). Ett sådant experiment klassificeras som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

9. Von Frey (mild)

Detta test uppmäter mekanisk känslighetströskel. Mössen hålls i plast/glas cylindrar på nätgolv i mellan max 30 min och 2 timmar för habituering. Känsligheten mäts genom upprepad applicering av olika Von

Frey-filament (varierade mellan 0,008 och 4g). Tillbakadragning eller ryckning av tassens registreras. Maximalt 50 applikationer av von Frey-filament utförs (de flesta av dem leder inte till någon reaktion). Test tiden är maximalt 3 h min per djur.

Denna applikation kan också upprepas som sensorisk stimulering och i dessa fall mellan 51 och 120 gånger (med samma tidsintervall, inte mer än 80 per tass, totalt maximal tid av stimulering inkl linters - 1.5 h). Ett sådant experiment klassificeras således som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

10. Pensel test (mild)

För detta test (Pensel test eller Dynamic Mechanical Allodynia) kommer mössen att placeras ovanpå ett trådnät och tillåts habitueras under 30 minuter till 2 timmar. Lätt mekanisk stimulering (som t.ex tryck eller "penslingsrörelse") med mjuk pensel, bomullspinne osv appliceras på baktassen (dorsal eller ventral). Varaktigheten och karaktären av reaktionen registreras under 1 min. Musen demonstrerar ryckning, grooming eller skaking av tassens. Varje test består av maximalt 10 repetitioner (lätt tryck med pensel, max 5 per tass), växelvis mellan båda tassarna med intervall på minst 10-60 s, för att få medelvärdet för enskild mus.

Denna applikation kan också upprepas mellan 11 och 50 gånger (med samma tidsintervall, inte mer än 25 per tass). Ett sådant experiment klassificeras som stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

11. Tröskeln för termiskt obehag (måttlig)

Detta är en tidigare publicerad metod (Gentry et al. Molecular Pain 2010, 6:4) för att mäta tröskeln för termisk smärta, vilket är mer relevant för studier av termisk hyperalgesi och allodyni. Djuret är fixerad via försiktigt fasthållen via enhandsgrepp om rygghuden och varje baktass placeras i sin tur på ytan av kylplattan. Därefter registreras hur lång tid det tar innan musen drar bort benet från plattan. Upp till 6 separata mätningar (omväxlande mellan tassar; max 4 per tass ges till de båda baktassarna) kommer att appliceras med 2 till 10 min intervall för att definiera medel dröjsmålstid för tass tillbakadragande. Avbrytningstid beror på temperatur och följer linjen: 15oC – 30s, 10oC – 25s , 5oC – 20 s, 0oC – 15 s . Plattan kan sättas in vid temperatur mellan 0oC och 50oC. Djur kommer att habitueras för begränsning i maximalt 7 dagar (kommer inte vara i följd) i upp till 15 min varje dag.

Denna applikation kan också upprepas mellan 7 och 12 gånger (med samma tidsintervall, inte mer än 12 per tass, totalt maximal tid av stimulering inkl intervall - 1.5 h). Ett sådant experiment klassificeras som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

12. Hot/Cold plate (måttlig/avsevärd)

Testet utförs genom att sätta djur på en platta (metall eller glas) med temperatur mellan -5oC till +55 oC medan djurens beteende observeras. Habituering utförs i högst sju dagar genom att sätta djur på plattan som håller omgivningstemperatur under högst 30 minuter. Testet genomförs i ett av två alternativa varianter:

1) Måttlig variant: latensen för den första reaktionen (skaka, slicka, hoppa) registreras och dåtasdjuret bort från plattan. Den maximala tid som ett djur kan stanna kvar på plattan kallas för avstängningstiden och definieras i denna fall som dubbel maximal reaktionstid av kontroll djur. Om ett djur uttrycker inga eller inte tillräckliga reaktioner, ska det inte lämnas längre på plattan än den musstam-specifika avstängningstiden..

2) Måttlig/avsevärd variant: ett djur stannar kvar på plattan och antalet, varaktigheten och karaktären på beteendeaktionen (lyft, skakning osv.) registreras. Avstängningstiden: +55oC– 30s; +52oC– 60s; +50oC– 90s; -5oC/48oC– 2 min; 47oC – 3 min; 46oC – 4 min; 0oC – 5 min.

Motivation för den avsevärda varianten: när djur utsätts för obehaglig temperatur uttrycker de två typer av beteenden, som förmedlas av två olika neuronala vägar. Den ena typen av beteende (t.ex tass lyftning) är en reflex vilket kommer först under obehaglig stimulering och antas förmedlas av ryggmärgsnervbanor (dvs lokala reflexvägar i ryggmärgen). Den andra typen av beteende (t.ex. tass "bevakning" och slickning) kommer senare, och kallas för "coping" dvs omhändertagande beteende och involverar andra populationer av celler i ryggmärgen och också specifika nervcellspopulationer i hjärnan. De två olika typer av beteende visar därför inblandning av olika (nerv) cells populationer och signalbanor och det är viktigt att de övervakas tillsammans, även om "coping" – beteendet uppträder med en viss fördröjning, vilket innebär att djur måste stanna längre kvar på plattan. Detta är standard

för att registrera ”coping” beteende och det finns ingen annan metod för att urskilja detta beteende eftersom det visar sig med en viss tidsförskjutning (dvs efter ”reflex” beteende) under exponering till obehaglig temperatur.

Den andra variant av Hot/Cold plate test rubriceras generellt som avsevärd, men kan klassificeras som måttligt om följande kriterier uppfylls: åtminstone 4 av 6 djur visar inga signifikanta spontana smärtbeteenden (tasslyftning, skakning osv) 20 min efter testslut. Djuren observeras då 5 minuter efter det har varit på behagligt ställe under 20 min. Dvs, vi tycker att detta experiment är avsevärd om ”medel” djur upplever obehag/smärta längre än 20 minuter efter exponeringen till obehaglig temperatur har upphört.

Inga djur kommer att få vävnadsskada av de använda temperaturerna, även om de ibland ligger över tröskeln för upplevd smärta. Djur kan alltid flytta kroppshållning och växla fötter för att stödja kroppen vilket gör att djuren kan påverka exponeringen av smärtstimuli.

13. Kyl/värme-smärttest (måttligt)

Mössen kommer att placeras ovanpå ett trådnät och tillåtas habituera under 30 minuter före testet påbörjas. 1 ml spruta fylld med en lösning (t.ex. vatten, aceton, ethanol/vattenblandning) hålls så att temperaturen av lösning inuti sprutan ligger mellan -20oC och +50oC. En lösningsdropp appliceras försiktigt på innersidan av en baktass (droppens temperatur ändrar snabbt redan innan droppen appliceras). Varaktigheten och karaktären av reaktionen (lyfta, skaka registreras under 1 min. Varje test består av maximalt 8 repetitioner (applicering av droppen), växelvis mellan båda tassarna med 1-10 minuters intervall. Total maximal testtid är 1 h (habituering ej inräknad).

Denna applikation kan också upprepas mellan 11 och 50 gånger (med tidsintervall 20 sec –5 min, inte mer än 30 per tass, max tid 90 min). Ett sådant experiment klassificeras som sensorisk stimulering och kommer inte att kombineras med något annat test eller stimulering under dag.

14. Kläm test (måttligt)

Detta test mäter mekanisk känslighet. Mössen placeras på en arena/metallnät i glascylindrar (i likhet med hur von Frey test utförs) under max 30 min med en 2 h habituering. En ”Alligator nypa” sätts fast på tassens under max 1 min (kraften i nypan är cirka 300-400g). Efter att nypan har tagits bort observeras djurens beteende under max 20 min och slickning, tass-skakning mäts. Ett maximum av 5 applikationer utförs med intervall om minst 10 minuter, max 3 per tass/dygn. Test tiden är maximalt 60 minuter per djur exkluderande habituering. Nypan tas bort omedelbart ifall djuren uppvisar en stark reaktion (skakar tassens mer än två gånger, hoppar eller vokaliserar). Dock är sådant beteende ej beskrivet i litteraturen varför vi inte förväntar oss denna typ av beteende.

Detta test kan inte kombineras under samma dag/djur/tass med Randal-Selitto testet. Applicering av alligator nypa resulterar aldrig i vävnadsskada, som tex skada på huden eller sårbildning. Som mest observeras att huden uppvisar en svag rödhet som försvinner efter några minuter.

Detta test kan också användas som sensorisk stimulering och i detta fall kan den upprepas max 20 gånger (med samma tidsintervall, dock ej mer än 10 gånger per tass, max tid för stimulering inkluderande intervall 1.5 timmar). Detta experiment är klassat som sensorisk stimulering och kan ej kombineras med andra test eller stimuleringar under samma dag.

15. Rotarod (måttlig)

Detta test utvärderar motorkoordination, balans, greppstyrka och motorinlärning hos möss som befinner sig på en roterande stång som är ca 3 cm i diameter och står på 30 cm höjd ovanför apparatens bas (Ugo Basile, Comerio VA, Italien). Habituering/träning: musen placeras på en stång med konstant roterande hastighet (2-5 rotationer per minut (rpm)), i maximalt 180 sekunder per dag i upp till 5 dagar i följd (eller med upp till 3 dagars intervall). Testet utförs på samma sätt, men efter att djuret sätts på stången börjar den accelerera långsamt upp till 60 rpm. Djuret faller från stången efter någon tid och denna tid registreras som ett mått på motorisk prestanda. Detta test kan vara maximalt 5 minuter och kan upprepas max 4 gånger (i.e. maximalt 20 min per dag/djur). Mellan testen sätts musen tillbaka till hemburen i minst 30 min.

16. Balktest (mild)

Detta test uppmäter motorkoordinering. Mössen kommer gå från en plan plattform till en annan plan plattform längs en smal plan yta (ett ”beam” (balk), mellan 5 och 30 mm bred och ca 1 m lång, förhöjd

ca 0,5 m över bordsytan). Musen tränas under upp till 5 dagar (efterföljande eller med ett till tre dagars intervall) med maximalt 5 försök varje dag (inte mer än 30 min totalt). På testdagen registreras den tid som behövs för att korsa "balken" och svårigheter med detta uppdrag registreras. Varje djur får göra upp till fyra testförsök på testdagen.

=====
Nedan kombinationer av test kommer inte att utföras under samma dag:

- 1) PAM; Randall-Selitto;
- 2) Icke smärtsamt aceton test; Kylsmärttest; Tröskeln för termiskt obehag (för kyla);3) Radiantheat;Tröskeln för termiskt obehag (värme); Hot plate. 4) Pinprick; Kläm test; Randall-Selitto.

Klassificering av svårighet av sensoriska test:

- * Ringa test (ingen stimulus appliceras eller djur bestämmer själv om att flyta till område varstimulusappliceras): Plats preferens, openfield
- * Milda test (djur har möjlighet att flytta fritt från stimuli innan den når nivå av obehag/smärta): Balktest, von Frey, Pensel test, Pinprick, Radiant heat, icke smärtsamt aceton test;
- * Måttliga test (stimulus nivå kan nå nivå av obehag/smärta men stimuli applikation upphör i samband med djurens reaktion eller om det visas att djur upplever smärta under mindre än 20 min i samband med test): Hot/Cold plate, Tröskeln för termiskt obehag, Rotarod, Randall-Selitto, Pressure Application Measurement (PAM), Kläm test och Kylsmärttest.
- * Avsevärda test (test som kan orsaka smärta men stimuli upphör inte även om stimuli når en nivå som orsakar obehag/smärta eller visar smärtbeteende längre än 20 min efter stimulus applikation upphört): det gäller särskild för Kemisk känslighet testning med karragenin och formalin och några variant av Hot/Cold plate test.

Sensorisk testning utförs med minimalt 2 dagar emellan. I enskilda fall kommer vi behöva utföra tester i maximalt tre dagar i rad. Då kan vi använda max 3 test per dag från ringa test och följande milda test: von Frey, Pensel test, Radiant heat, icke smärtsamt aceton test.

Under en dag med sensoriska test kan samma djur få maximalt en avsevärd och 2 måttliga test. Maximalt kan 5 avsevärda test utföras per djur i denna grupp, bland dem, kemisk känslighetstest kan utföras max 3 gång per djur (en gång per samma område på huden). Maximalt kan 12 avsevärda test utföras per djur om den inte utsätts för "centrala mekanism" åtgärd, bland dem, kemisk känslighetstest kan utföras max 3 gång per djur (en gång per samma område på huden). Om djur utsätts till "den andra åtgärd av centrala mekanismer", utföras max 3 avsevärda test per djur.

För maximalt test, av de avsevärda och testning dagar per djur i alla försöksgrupp, se Bilaga 1, sida 2.

Djur kommer att uppleva stress och besvär, ibland även smärta i samband med sensorisk testning. De flesta av våra sensoriska test kräver stimulans av stillastående djur. Sådan position förutsätter att ett djur är helt nöjd med sin nyfikenhet, dvs förlorat intresse för miljön som ett resultat av utforskningar. Det är det som är syftet med en habituering. C57bl6-möss (de flesta av våra stammar har denna genetiska bakgrund) är väldigt aktiva och det tar upp till en timme för dem att lugna sig efter habituering. När det passar använder vi en habituering för flera test, men det är endast möjligt för test som utförs på samma plattform/arena. Om djuret måste flyttas till en annan plattform för testning (dvs miljön ändras) behöver vi upprepa habituering. Med denna motivation behöver vi ha maximalt 2 timmars habituering per dag plus upp till 6 timmars testning (totalt – 8 h).

Djur kan ofta under denna tid hamna mellan sömn och vakenhet vilket tyder på att de inte stressas. Vi anser därför att dessa test inte medför särskild stress / lidande för djur eftersom 1) djur tycks villiga att utforska nya miljöer; 2) de flesta av våra sensoriska test utförs på fritt rörliga djur, så att de alltid har möjlighet att flytta på sig när stimulans når (eller närmar sig) en obehaglig nivå. I de flesta fall blir tiden för testning mindre än den maximal som vi uppger i ansökan.

Djuren kan uppleva stress i samband med beteendeförsöken men om detta utförs repetitivt och likadant varje gång minskar stressen avsevärt.

För detta och andra försöksgrupp gör den minsta tiden mellan sensorisk testning (minst 2 dagar mellan varje testomgång) att djuren hinner återhämta sig fullt innan nästa test. Detta bekräftas av att

känsligheten mellan olika testdagar inte förändras hos djuret. Testen i sig påverkar således inte smärtekänsligheten.

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

Dessa test är väletablerade i litteraturen och gör det möjligt att jämföra hur olika typer av känslighet påverkas i samma djur. Det är viktigt att använda etablerade metoder för att jämföra nya resultat med gamla.

Vi behöver utföra många kombinationer av sensoriska test för att förstå vilken typ av överkänslighet och neuron som är inblandade i det normala djuret och vid olika typer av kronisk smärta. Motivering för behovet av maximalt fem sensoriska test per dag.

Vi kan inte använda färre än maximalt antalet test per djur under dag av följande skäl: varje specifik smärtmodell (dvs denna försöksgrupp samt nedan försöksgrupper) är i viss grad individuell mellan djur eftersom flera olika neuronala populationer arbetar tillsammans för att påverka känsel och dom gör det i olika grad för olika typer av känsel. På grund av detta påverkas olika typer av känsel i olika grad hos enskilda djur. Således måste vi ha möjlighet att jämföra resultaten av olika test som erhållits från ett och samma djur. Med andra ord, att testa ett djur i fem test ger mycket mer information än att testa två djur i två eller tre olika test vardera. Information om hur värme, kyla, mekanisk aspekt av smärta och klåda påverkar samma organism (korrelerar med varandra) är en viktig aspekt som återspeglar molekylära och cellulära mekanismer av smärta, vilket är det vi studerar.

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

Djur kommer att habitueras före testning. När möjligt används mindre invasiva test och test som baseras på fri rörlighet hos djurens beteende. Stimuli applikation kommer inte att upprepas fler gånger än vad som krävs för att få mätningar som ger hög reproducerbarhet och känslighet.

Undantag

- Söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Motivering: Djur kan inte ges smärtstillande behandling eftersom studerar vi smärta och behöver mäta känslighetströskel.

Åtgärd 4: Rutiner under kirurgiska ingrepp

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Denna åtgärd beskriver allmän praxis som vi använder för olika kirurgiska ingrepp. Beskrivning av specifika kirurgiska ingrepp ges nedan i denna försöksgrupp. För alla kirurgiska ingrepp kan alternativ anestesi eller smärtlindring ges vid behov efter rekommendation av veterinär.

*** UNDER INGREPP**

Under narkos (längre än 15 minuter) ligger musen på en varm dyna (ej i samband med avlivning). Om narkos varar i mer än 45 min ges 0,25 ml steril saltlösning s.c. Därefter ges steril saltlösning (ca 0,25) var 45 min av narkos. Detta kan utföras med nålen som sitter kvar sc under hela ingrepp och riktas om mellan injektioner. Narkos kommer inte att användas under en längre tid än 3 h. Ögonsalva appliceras för att förhindra korneal uttorkning under narkos (dock ej i samband med avlivning).

*** EFTER INGREPP**

För alla kirurgiska ingrepp kan det bli nödvändigt att söva djuren samt att sätta nya suturer utifall att någon sutur skulle gå upp.

Smärtstillande injektion ges vanligt som sc men i några situationer kan ersättas med ip.

I vissa situationer kommer vi lägga djur under narkos innan vi utför ip eller sc-injektion (inklusive smärtstillande medel). Narkos kan vara att föredra när injektion utförs på nyligen opererade djur,

särskilt efter i.sp eller i.cr. T.ex. när i.p eller s.c utförs på vakna djur, hålls det med rygghudgrepp vilket kan innebära störning av det senaste kirurgiska såret. Detta kan resultera i onödigt djurlidande, längre sårsläkning och ökad variation mellan djur.

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

Kirurgi är nödvändigt för olika anatomiska manipulationer, till exempel applicering av leveransvirus eller andra spårningsföreningar till olika anatomiska strukturer.

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

Denna åtgärd beskriver allmän praxis för kirurgiska ingrepp och det mesta syftar till att minska djurens lidande.

Kirurgiska ingrepp kommer att utföras under anestesi. För att minimera risken för infektioner i samband med ingreppet kommer aseptisk teknik och sterila instrument att användas. För alla kirurgiska ingrepp ges smärtlindring vid behov efter rekommendation av veterinär.

Åtgärd 5: Spårningsämne leverans till centrala nervsystem

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Denna åtgärd används i alla försöksgrupper nedan.

Vi kommer att administrera AAV, Rhabdovirus, Lentivirus, HSV, annat virus eller spårningsämne till nervsystem. Detta kan utföras som intratekal injektion, i.t., (som är en injektion i subaraknoidutrymmet dvs i cerebrospinalvätskan, CSF, dvs. mellan ryggmärgen och inre ytan av ryggraden); intraspinal injektion (dvs. injektion i ryggmärgen), i.sp. och/eller som , injektion i hjärnan (intrakraniell injektion, i.cr.) eller deras kombination.

Tidpunkten för åtgärden kan skilja sig mellan djuren men detta påverkar inte djurens välbefinnande. För allmän beskrivning av kirurgiska ingrepp se ovan åtgärd "Rutiner under kirurgiska ingrepp".

INTRATEKAL INJEKTION kan utföras igenom hud eller med hudens öppnande (det kan krävas för bättre precision vid injektion). Medan djuret är under narkos se lokal bedövning utförs. Då görs 2-3 cm snitt i huden, en 30-gauge nål (eller liknande) sätts genom på nedre delen av ryggen i anslutning till L5 eller L6 nerven. Nålen kommer nå fram till området mellan ryggkotornas spinösa och tvärgående processer. Maximalt 10 ul volym av lösning (virus eller annan) kommer att injiceras långsamt. Efter nålen avlägsnas stängs huden med suturer. Efter detta ingrepp hålls djuret under uppsikt tills det vaknar. Djuret kontrolleras under 30 min efter injektion för uppenbar motorisk försämring. För intratekal injektion med hudsöppningen använder vi lokalbedövning och Karprofen (en gång) alt Temgesic (2 ggr), se alt ip.

Denna åtgärd har måttlig svårighetsgrad. Djur kan komma att uppleva mindre obehag i samband med anestesi och intratekal injektion.

INTRASPINAL (i.sp): Karprofen ges t.ex s.c. Djur sövs djur med isofluran, sedan flyttas till stereotaktisk ram på en värmematta. Andningsnivån övervakas konstant. Ögonsalva appliceras för att förhindra uttorkning av hornhinnan under operationen. Avsedd del av huden är rakad. Huden sköljs med klorhexidinsprit, jodlösning eller likn. och låts torka. Ett 2-3 cm snitt görs på ryggen (cervikal eller lumbar). Ryggraden fixeras på plats med hjälp av s.k. spinaladaptar, och paraspinala muskler och vävnader som omger dessa ryggkotor avlägsnas. Lokalbedövning kan appliceras som liten droppe om det inte hindrar uppnåendet av experimentets syfte. "Ett litet hål görs i hinnan med en stål nål. En vass glaskapillär placeras långsamt in i ryggmärgen till önskat djup. När kapillären är på plats injiceras cirka 300 nL viral (eller annat spårämne) lösning i ryggmärgen. Efter injektionen lämnas kapillären kvar på plats i 5 min för att låta lösningen diffundera. Sedan tas kapillären långsamt bort. Vi behöver göra maximalt 3 injektioner, med max 1,5 mm avstånd till varandra för att leverera lösningen till en stor del

av ryggmärgen. Efter injektionerna sys huden ihop med sterila silkesuturer (alt Supramid).

INTRAKRANIELL (i.cr.): Karprofen ges t.ex sc. Djur sövs med isofluran, sedan flyttas till stereotaktisk ram på en värmematta. Avsedd del av huden rakas. Huden sköljs med klorhexidininlösning eller jodlösning och låts torka. Ca 1 cm långt snitt görs i huden ovanför skallbenet. Lokalbedövning kan appliceras som liten droppe om det inte hindrar uppnåendet av experimentets syfte. Ett litet hål borras med en tandborr för att kunna nå önskad del av hjärnan. En glaskapillär fylld med viral (eller annat spårande ämne) lösning sänks långsamt till rätt djup. När kapillären är på plats injiceras cirka 250 nL lösning långsamt i hjärnan. När injektionen är klar lämnas kapillären på plats i 5 minuter för att tillåta diffusion av lösningen. Glaskapillären dras därefter långsamt tillbaka under 15 minuter för att undvika skada på den omgivande vävnaden. Huden stängs med silkesuturer (alt Supramid). Lokalbedövning (Xylocain-krem eller Marcain) appliceras direkt innan ingrepp men om det finns risk att detta kan påverka procedur negativt (t.ex om ämne penetrerar ingreppsställe) kan krämen appliceras efter ingrepp istället.

För i.sp och i.cr administrationer, karprofen kan ges i upp till tre dagar ytterligare om ett djur uttrycker tecken på smärta eller lokal inflammation på det opererade stället. Normalt vaknar möss och återhämtar sig inom 10 minuter efter operationen. Vi övervakar dem i 15 minuter efter operationen. I de flesta fall förväntar vi oss att de ska röra sig fritt efter återhämtning. Djur är kapabla att röra sig fritt för att nå mat och vatten. Dessa åtgärd har måttlig svårighetsgrad.

På de flesta djur kommer bara ett ingrepp av de tre ovanför beskriven utföras och detta klasseras som måttligt experiment. Ibland kan kombination av maximal två ingrepp (t.ex i.sp + i.cr; i.sp + i.sp eller i.cr + i.cr) utföras med åtminstone en veckas intervall. Två injektioner på samma djur är avsevärd och ska utföras i mindre än 10% av djuren.

Djur upplever obehag och smärta i samband med anestesi och intraspinal injektion. Ämnena (inkl virus) i sig leder inte till förändring i djurens hälsa. Bara Rhabdovirus leder till att några nervceller dör och kan orsaka försämring av djurens hälsa.

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

Vi studerar rollen av specifika gener och/eller celler involverade i smärtmekanismer. För detta behöver vi leverera olika ämnen (framför allt virus) på ett effektivt sätt till specifika områden av nervsystemet. Två injektioner (intrakranial och intraspinal) krävs när en injektion inte räcker för att nå det experimentella syftet. Till exempel för att en specifik spårning av en cellgrupp i hjärnan (som har axoner i ryggmärg) kan vi behöva spåra denna grupp både lokalt (intrakranial injektion) och distalt (intraspinal injektion) med olika virus. Genom detta kan vi spåra hur specifika celltyper som uttrycker en markör (nås med intrakranial injektion) skickar axoner till ett specifikt område och/eller celltyp i ryggmärgen (nås med intraspinal injektion).

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

Injektionen kommer att utföras under anestesi. För att minimera risken för infektioner i samband med ingreppet kommer aseptisk teknik och sterila instrument att användas. Alla möss kommer att övervakas en gång om dagen för tecken på smärta. Djuret kontrolleras under 30 min efter injektion för uppenbar motorisk försämring. Extra tillsyn för i.cr och i.t. utförs åtminstone en gång nästa dag efter ingrepp. För i.sp utförs extra tillsyn en gång varje dag (oftast av en forskare) av åtminstone två följande dagar efter ingrepp.

Karprofen kan ges i upp till tre dagar ytterligare om ett djur uttrycker tecken på smärta eller lokal inflammation.

För ytterligare detaljer av kirurgisk ingrepp se ovan åtgärd "Rutiner under kirurgiska ingrepp". Mössen kommer att avlivas om de är förlamade till följd av operationen (detta kan hända efter i.sp, i.cr eller i.t; blir uppenbart direkt efter återhämtningen och händer bara i sällsynta fall) eller på något annat sätt når 0,4 på en enskild parameter). Avbrytningspunkt är 0.6 12 timmar efter kirurgisk ingrepp.

Åtgärd 6: Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala cellpopulationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för känslighet, framförallt smärta. För att "hitta" vilka de cellerna är som aktiveras vid olika tillstånd utförs farmakologisk intervention eller så exponeras djuren för beteende procedurer som aktiverar dessa celler. Dessa grupper av alternativa åtgärder kallades "centrala mekanismer" och inkluderar:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande (denna åtgärd);

Åtgärd: Pågående stress;

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet; Åtgärd: Sömnbrist;

Varje djur i denna försöksgrupp exponeras normalt endast för ett av nämnda alternativa procedurer. För ett begränsat antal djur (mindre än 10%) kommer dock djur att få en ytterligare åtgärd från denna grupp. Detaljerna för hur och varför den andra åtgärden av denna grupp utförs beskrivs i separat åtgärd nedan "den andra åtgärd av centrala mekanismer".

Tidpunkten för proceduren kan skilja sig mellan djur längs det experimentella protokollet, men detta påverkar inte djurets välfärd.

Möss behandlas med ökande dos morfin: max 3 sc injektioner per dag (max volym 10 ml/kg), start vid max 7 mg/kg med långsam ökning till 160 mg / kg (max 200 mg / kg) för 6 (max 7) dagar . Följande dag (dag7) efter ca 3 timmar efter den sista opioid administrationen behandlas djuren med den kompetitiva antagonisten naloxon (eller liknande, i.p., 3 mg/kg, max 3.5 mg/kg, max volym 20 ml/kg) för att skapa symptom för opioid abstinens.

I vissa situationer kan djur behandlas med morfin under max 10 dagar. Dessa 3 extra dagar kan komma vara nödvändig för att kunna testa effektiviteten av genetisk manipulation. Naloxon kan behandlas max en gång per dag, som mest 4 administrationer.

Denna åtgärd klassas som avsevärd. Djuren kommer att uppleva obehag i samband med injektioner. Akuta abstinensbesvär pågår under max 90 minuter efter naloxon injektion och inkluderar diaree, tremor, hyperaktivitet och mekanisk och värme/kyla överkänslighet. Under denna tid kan KI mallen uppnå 1.2, där 0.4 kan förekomma för individuella parametrar (tex diaree). Mindre, men dock synbara symptom, för abstinens kan fortgå under 4-7 dagar efter tillbakadragande av opioider men kommer under denna period inte gå över avbrytningspunkt för detta tillstånd (0.8 och 0.4 för individuella parametrar).

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

Alla åtgärder nämnd i grupp "centrala mekanismer" påverkar tydligt känsligheten (och därmed smärtuppfattning) hos människor. Denna modifikation i känsligheten beror på molekylära och cellulära förändringar i det neuronalt nätverket som hanterar sensorisk information. Hela syftet med detta projekt är att hitta vilken aspekt av sensorisk/smärta, informationsbearbetning som kontrolleras av hjärnans cellpopulationer och som därmed blir aktiverade av åtgärder från "centrala mekanismer" grupp. Det enda sättet att hitta dessa celler och mekanismer är att utsätta djuren för dessa upplevelser, dvs aktivera dessa neuroner. Då dom är hittade kan vi artificiellt manipulera aktiviteten hos denna grupp av celler (aktivera eller inaktivera) och registrera hur detta påverkar smärtupplevelsen både vad gäller normal känslighet och vid utveckling av kroniska smärttillstånd som nervskademodell eller reumatoid artrit.

Åtgärder i gruppen "central mekanism" är ett kärnmoment av projektet och "Opioid tillbakadragande" är en av dem

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

Djuren kommer att observeras under hela 60-90 minuter testperioden efter administrering av opioid antagonist. Efter testperiod kommer djuren att observeras minst en gång per dag under upp till 4 dagar.

Åtgärd 7: Centrala mekanismer: pågående stress

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala cellpopulationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för känslighet, framförallt smärta. Med detta syfte utförs farmakologisk intervention eller exponeras djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa celler. Dessa grupper av alternativa åtgärder kallades "centrala mekanismer" och inkluderar:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande;

Åtgärd: Pågående stress (denna åtgärd);

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet; Åtgärd: Sömnbrist;

Varje djur i denna försöksgrupp exponeras normalt endast för en av nämnda alternativa procedurer. För begränsat antal djur (mindre än 10%) kommer vi dock att utsätta djur till en ytterligare åtgärd från denna grupp.

Detaljerna för hur och varför den andra åtgärden av denna grupp utförs beskrivs i separat åtgärd nedan "den andra åtgärd av centrala mekanismer". Med andra ord endast djur som utsätts till åtgärd 13 nedan ("Den andra åtgärd av centrala mekanismer") utsätts till den andra behandling av den "centrala mekanism" gruppen (åtgärd 6-9).

Tidpunkten för proceduren kan skilja sig mellan djur längs det experimentella protokollet, men detta påverkar inte djurets välfärd.

Pågående stress utförs genom en av två alternativa metoder.

1) Immobilisering. För att inducera stress fasthålls möss i ett välventilerad 50ml rör (eller liknande) under max 6 timmar per dag (Zimprich et al., 2014). Denna procedur utförs max 1 gång per dag under max 21 dagar (antingen kontinuerligt eller med max 2 dagars intervall).

2) Simmningstestet

En stor bägare med diameter 20 cm fylls med vatten 20-30°C. Vattnets temperatur kontrolleras inför varje test med djur. Nivån på vattnet gör att musen inte når botten och måste simma. En mus placeras i varje bägare, musen kan inte undfly att simma. Efter ett par minuter slutar musen att simma och börjar flyta med endast huvudet ovanför vattnet. Möss flyter bra i vatten och brukar inte sjunka eller dyka. Varje mus monitoreras hela tiden när åtgärd utförs. I det fall musen sjunker eller dyker avbryts testet omedelbart. Musen hålls max 30 minuter i bägaren om testet utförs bara en gång per dag. I så fall, kan försöket upprepas flera dagar i rad eller med en vilodag emellan (max 7 dagar). Om testet utförs flera gånger per dag (max 4x) minskar max tiden i bägaren till 20 minuter, och testet får upprepas max under 3 dagar.

Denna åtgärd är avsevärd.

Djuren kommer att uppleva obehag i samband med ökad stress. Symptomen för ökad stress liknar de vid mild depression, och kan inkludera överkänslighet och minskat socialt beteende. För detta protokoll så är avbrytningspunkten densamma som för de andra delarna av denna ansökan.

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

Denna åtgärd är en av flera åtgärder från gruppen "centrala mekanismer", ett centralt moment av hela denna studie.

Det finns en stark koppling mellan kronisk stress och kronisk smärta hos människa. Avsikten är att hitta/identifiera cellpopulationer som orsakar kopplingen mellan kronisk stress och smärta.

Principen för hur neuronala nätverk fungerar är att det finns ett antal positiva och negativa signaler till ett ställe i hjärnan där dom integreras/sammanförs till ett svar. För smärta så sammanstrålar många

olika signaler som påverkar hur mycket smärta som känns, tex sömn, tillbakadragande av opioider eller stress. Att förstå de neuronerna och nätverk som sammanstrålar och tillsammans påverkar smärtan är en stor osvarad fråga inom smärtfältet. Ett svar och förståelse för dessa mekanismer kan vara till hjälp för att hitta nya behandlingssätt vid olika typer av kronisk smärta men också vid sk komorbiditeter där smärta är sammankopplat med andra faktorer såsom insomni eller stress. En vägande bedömning kring djurens situation under dessa försök och potentiell nytta av ny kunskap inom detta relativt outforskade området för patienter med obehandlingsbar kronisk smärta som påverkar deras liv så motiveras dessa försök att utföras. Ingen principiellt ny behandling för kronisk smärta har tagits fram under de senaste årtiondena och det finns ett stort behov pga av avsaknaden av smärtlindrande behandlingar som har en god effekt och fungerar på alla. Som nämnts ovan, är smärta ofta kopplat till andra tillstånd såsom brist på sömn och stress. Detta är fokus inom denna ansökan. För att förstå dessa kopplingar måste djuren i våra försök vara med om dessa upplevelser. Om dom gör det, kan vi ”fånga” med avancerade genetiska metoder exakt de celler som orsakar sambanden och förklara exakt hur sambanden ser ut och hur de kan manipuleras för att minska smärta i patienter.

Det är oklart vilken modell för kronisk stress som fungerar bäst på våra musstammar. Den mest använt modellen är

”immobilisering”, men i all om den inte har någon eller föga effekt, vill vi kunna använda den andra modellen ”simningstestet”. Dessutom måste vi ha möjligheten att reproducera och/eller jämföra våra resultat med tidigare publicerade rapporter, och då kan vi behöva använda båda stressmodellerna (på olika djur).

”Immobilisering” 6 timmar per dag under flera veckor är den standardiserade metoden för stress inducering (Yun et al., 2010, Christiansen et al., 2011, Galea et al., 1997). Vi vill kunna använda ett etablerat protokoll och inte utveckla någon ny modell för stress. En minskning av immobilisering minskar också stressen vilket antingen gör att försöket misslyckas eller i bästa fall resulterar i att vi måste öka antalet djur i försök. Vi kan testa först med ett 14 dagar stress paradigm men vi antar att det inte kommer att räcka, dvs vi tror att det finns en anledning till att andra publiceringar inom området använder 21 dagar, men aldrig färre dagar.

Eftersom vi test oss fram för att förstå hur detta försök bäst kan utföras, kan vi inte veta om vi kan minska olika parametrar av protokollet, t.ex. minska immobiliseringstid per dag eller minska antalet dagar med immobilisering.

Under immobiliseringsperioden (max 6 h) har djur inte tillgång till mat och vatten. Detta bidrar dock inte mycket till den annars stressande djursituationen. Från tidigare rapporter vet man att berövande av 6 timmar vatten och mat endast har en liten negativ effekt på djuren. Vi tror att introduktionen av en paus där vatten/mat ges till djuren kommer att leda till att syftet med försöket inte kommer att kunna nås.

”Forced swim” testet används vanligtvis som experiment i forskningsmiljö för att mäta benägenhet till depression. Då tvingas möss att simma upp till 10 minuter. Däremot är vårt syfte att inducera stress och vi vet att musstammar har olika dispositioner till att bli stressade. Även om vi riktar oss mot 10 minuter tvingat tid i bägaren, behöver vi möjligheten att förlänga denna tid upp till 30 minuter, om det visar sig nödvändig.

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

Behållare för immobilisering är av det slag som ger god ventilation och av en storlek som inte är mindre än vad som krävs för försöket. Vattnet för simtestet är av rumstemperatur, eller något högre. Djur torkas med servetter efter simningen så att det inte blir nedkylda efter upptag från vattnet.

Åtgärd 8: Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala cellpopulationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för känslighet, framförallt smärta. Med detta syfte utförs farmakologisk intervention eller exponeras djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa celler. Denna grupp av alternativa åtgärder kallades "centrala mekanismer" och inkluderar:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande;

Åtgärd: Pågående stress;

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet (denna åtgärd);

Åtgärd: Sömnbrist;

Varje djur i denna försöksgrupp exponeras normalt endast för en av nämnda alternativa procedurer. För begränsat antal djur (mindre än 10%) kommer vi dock att utsätta djur till en ytterligare åtgärd från denna grupp. Detaljerna för hur och varför den andra åtgärden av denna grupp utförs beskrivs i separat åtgärd nedan "den andra åtgärd av centrala mekanismer".

Tidpunkten för proceduren kan skilja sig mellan djur längs det experimentella protokollet, men detta påverkar inte djurets välfärd.

Mössen placeras på ett motionshjul vid låg hastighet (max 5 cm/s) under 12 timmar. För att säkerställa att djuren förblir på motionshjulet så finns en spänning (ej mer än 1.5 mA, men vi syftar att använda normalt 1.2 mA) på motionshjulets bas vilket gör att musen får en mild elektrisk stöt om den lämnar motionshjulet. Detta gör att musen motiveras att stanna kvar i motionshjulet. Maximalt kan en mus utsättas för 10 elektriska stötar under första dagen (vi vet från andra labb att det normalt inte överstiger 6 stötar under första dagen) och 6 stötar under följande dagar (om det är 3 dagars intervall eller mindre efter föregående "löpningsdag"). Maximalt utsätts djur till 7 motionsepisoder, max en episod per dag och max två dagar i följd. Proceduren är således bara utförd två dagar varje tredagars cykel (Tartar et al., 2009). Möss fattar snabbt att de inte får lämna hjulet, dvs vi hoppas att vi kan jobba med begränsning av totalt 20 elektriska stötar inom hela protokollet (dvs 7 motionsepisoder).

Denna åtgärd (pågående fysisk aktivitet) är nästan identisk med den följande (sömnbrist). Skillnaden är att den nuvarande åtgärd utförs under nattetid (d.v.s. stör inte sömncykeln) och sömnbrist utförs på dagtid. Således har den första åtgärd antagligen bara en fysiologisk effekt - fysisk aktivitet, medan den andra har dubbel effekt: fysisk aktivitet och sömnbrist.

Denna åtgärd är av avsevärd svårighetsgrad.

Djur kan uppleva besvär i samband med procedur till exempel tvingad fysisk aktivitet och kort begränsning av tillgången till mat och vatten. Djur kan också uppleva stress i samband med elektriska stötar.

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

Lågintensitetsträning är känt att ha positiva hälsoeffekter, inklusive på smärtekänslighet. Vi vill undersöka vilka specifika cellpopulationer i hjärnan som är inblandade i denna process. Vi behöver också att ha denna åtgärd som kontroll till nästa åtgärd, sömnbrist.

Eftersom elektrisk chock kan tyckas som en mycket negativ upplevelse för djuren, så måste man tänka på att för varje djurart så kan storleken på den negativa effekten styras genom strömstyrkan på elektriciteten. Strömstyrkan som används i dessa försök är inte av den art att den leder till smärta, utan enbart för att orsaka obehag så att musen inte avbryter beteendet som studeras. Om man har upplevt texten den svaga elektriska chocken från en mobiltelefonladdare så kan man relatera till ovan försök.

Orsaken till att det inte orsakar smärta är att strömmen är svag, men tillräcklig för att man ska undvika att leka med mobiltelefonladdaren på samma sätt. Elektriska staket är rutinmässigt använda inom jordbruket för att förhindra att djuren lämnar sina betesområden. Antalet elektriska chocker som djuren upplever i en kombination med hur stark strömmen är avgör antalet chocker som djuren får innan dom lärt sig att undvika staketet. Vi kan inte i detalj beskriva exakt hur mössen upplever springhjulet med elektriska chocker men vet från tidigare studier att den ström som används i vår modell är inom ramen för obehag och att djuren normalt lärt sig inom 5-6 gånger under den första timmen av inläring och sedan 2-3 gånger under de efterföljande 5-6 timmarna. I efterföljande försök har dom lärt sig och exponeras inte för mer 3 elektriska chocker. Elektriska strömmen är som ovan beskrivet inställd så att den precis leder till att djuren fortsätter att gå i springhjulet. Vi är förstas villiga att göra försök där vi minskar strömmen så till så låg nivåer som är möjligt utan att påverka försökets upplägg, dvs att djuren fortsätter att gå i springhjulet. Minskning av strömmen leder dock, som ovan beskrivet, till ett ökat antal chocker.

Detta test är designat för att simulera utdragen lågintensitet träning och leder inte till djurens utmattnings. Springhjulets hastighet är låg, bara 5cm/s, vilket är ca 6% av musens snitthastighet då den springer frivilligt. Den totala distansen (2,16 km) är bara drygt 20% av den som möss springer i fångenskap per natt. Både hastighet och längd som musen springer är således helt inom dess normala fysiska aktivitet.

Djuren kommer att under 5 minuter varje 4 timmar föras över till hemburen med tillgång till mat och vatten. Det gäller för både åtgärder, "fysiska aktivitet" och "sömnbrist".

Det finns tillgängligt information som hjälper att resonera på vilken sätt djur påverkas under springning under dag eller natt. I båda varianter säkerställer 5 min paus åtminstone var 4e timme att det inte blir någon betydande negativ effekt som orsakas av tillfälligt tillgångsuppehåll till mat och vatten.

Det finns mycket litteratur som antyder att så länge möss har tillgång till mat och vatten ad libitum 12 timmar per dygn, finns ingen inverkan på vikt och detta är oberoende om det är dag eller nattetid (t.ex. Kolisnyk et al 2012, Acosta-Rodriguez et al, 2017). Acosta-Rodriguez visar dessutom att det även är fallet om djur ges föda bara under natten över en period av 43 dagar i sträck. Eftersom våra experiment pågår högst 14 dagar och att våra djur får vilodagar och pauser under motionsfaserna, väntar vi oss inga negativa effekter på kroppsvikt.

Möss är mest nattaktiva och 2/3 av näringsintag utförs under natten. (Acosta-Rodriguez et al., 2017, Kolisnyk et al., 2013). Inskränkning av tillgång till mat under dagen påverkar inte deras dagliga intag, om mat är tillgänglig under natten. Möss utjämnar bristen under dagen med att konsumera mer under natten.

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

Motionshjul används som max under två dagar i rad.

Under försöket monitoreras djuren hela tiden. Efter försöket examineras djuren en gång per dag under 2-3 dagar för att säkerställa att de inte går ner i vikt och att dom har ett normalt beteende inkl grooming som tyder på varaktig stress.

Utföraren av försöken kommer att vara i rummet under hela procedur och kommer att kolla att djuren är okey varje 5 min. Djuren kommer att sättas in i hemburen varje fyra timmar och få tillgång till mat och vatten under fem minuter.

Åtgärd 9: Centrala mekanismer: sömnbrist

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala cellpopulationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för känslighet, framförallt smärta. Med detta syfte utförs farmakologisk intervention eller exponeras djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa celler. Denna grupp av alternativa åtgärder kallades "centrala mekanismer" och inkluderar:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande;
 Åtgärd: Pågående stress;
 Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet;
 Åtgärd: Sömnbrist (denna åtgärd);

Varje djur i denna försöksgrupp exponeras normalt endast för en av nämnda alternativa procedurer. För begränsat antal djur (mindre än 10%) kommer vi dock att utsätta djur till en ytterligare åtgärd från denna grupp. Detaljerna för hur och varför den andra åtgärden av denna grupp utförs beskrivs i separat åtgärd nedan "den andra åtgärd av centrala mekanismer".

Tidpunkten för proceduren kan skilja sig mellan djur längs det experimentella protokollet, men detta påverkar inte djurets välfärd.

Denna åtgärd utförs precis på samma sätt som åtgärd ovan, "pågående fysisk aktivitet" fast under dagtid. Detta innebär att djur upplever inte bara fysisk aktivitet effekt (se beskrivning ovan) utan också sömnbrist.

Denna åtgärd är av avsevärd svårighetsgrad.

Djur ska uppleva besvär/stress i samband med elektriska stötar och sömnbrist.

Mindre besvär kan orsakas av fysisk aktivitet och kort begränsning av tillgången till mat och vatten.

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

Sömnbrist bidrar till negativa hälsoeffekter, inklusive på smärta. Vi vill undersöka huruvida specifika regioner i hjärnan är inblandade i denna process.

Denna modell av sömnbrist (baseras på "running wheel") är den mest etablerade och dess implementering är minst invasiv för djur.

Principen för hur neuronala nätverk fungerar är att det finns ett antal positiva och negativa signaler till ett ställe i hjärnan där dom integreras/sammanförs till ett svar. För smärta så sammanstrålar många olika signaler som påverkar hur mycket smärta som känns, tex sömn, tillbakadragande av opioider eller stress. Att förstå de neuroner och nätverk som sammanstrålar och tillsammans påverkar smärtan är en stor osvarad fråga inom smärtfältet. Ett svar och förståelse för dessa mekanismer kan vara till hjälp för att hitta nya behandlingssätt vid olika typer av kronisk smärta men också vid sk komorbiditeter där smärta är sammankopplat med andra faktorer såsom insomni eller stress. En vägande bedömning kring djurens situation under dessa försök och potentiell nytta av ny kunskap inom detta relativt outforskade området för patienter med obehandlingsbar kronisk smärta som påverkar deras liv så motiveras dessa försök att utföras. Ingen principiellt ny behandling för kronisk smärta har tagits fram under de senaste årtiondena och det finns ett stort behov pga av avsaknaden av smärtlindrande behandlingar som har en god effekt och fungerar på alla. Som nämnts ovan, är smärta ofta kopplat till andra tillstånd såsom brist på sömn och stress. Detta är fokus inom denna ansökan. För att förstå dessa kopplingar måste djuren i våra försök vara med om dessa upplevelser. Om dom gör det, kan vi "fånga" med avancerade genetiska metoder exakt de celler som orsakar sambanden och förklara exakt hur sambanden ser ut och hur de kan manipuleras för att minska smärta i patienter.

För motivation runt användning av elektrisk chock - se ovan i åtgärd "Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet".

Möss är mest nattaktiva och 2/3 av näringsintag utförs under natten. (Acosta-Rodriguez et al., 2017, Kolisnyk et al., 2013). Inskränkning till mat under dagen påverkar inte deras dagliga intag, om mat är tillgänglig under natten. Möss utjämnar bristen under dagen med att konsumera mer under natten.

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

Motionshjul används som max två dagar i rad.

Utföraren av försöken kommer att vara i rummet under hela procedur för att kontrollera varje 5 min att

djuret är okey.

Efter åtgärden utförts examineras djuret en gång per dag under 2 dagar för att säkerställa att de inte minskat i vikt och att de har ett normalt beteende inkl grooming som tyder på varaktig stress. Djuret kommer att under 5 minuter varje 4 timmar föras över till hemburen med tillgång till mat och vatten. Dessutom kommer möss ha tillgång till foder och vatten som vanligt under natten, och vi väntar oss därmed inga effekter på kroppsvikt.

Åtgärd 10: Den andra åtgärd av centrala mekanismer

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Ett fåtal djur (max 150 st) kommer att utsättas för en ytterligare åtgärd från fyra åtgärder i "centrala mekanismer" grupp.

Åtgärd 6: Opioid tillbakadragande;

Åtgärd 7: Pågående stress;

Åtgärd 8: Pågående fysisk aktivitet;

Åtgärd 9: Sömnbrist;

Det kan vara en upprepning av samma åtgärd eller en annan av fyra nämnda åtgärder.

Specifika åtgärder utförs enligt beskrivningen ovan (åtgärd 6-9)

Utföra kombination av två åtgärder från denna centrala mekanisms är mycket viktig för att uppnå syftet med försöken (som kan inte nås på annat sätt), se Motivation nedan.

Möjliga kombinationer av åtgärder är:

Upprepning av detsamma åtgärd (gäller för 6-9); Pågående stress med antingen pågående fysisk aktivitet eller sömnbrist.

Minsta intervallen mellan den första och den andra åtgärden av centrala mekanismen är 10 dagar.

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

Vi måste utföra denna åtgärd (dvs den andra åtgärd från den centrala mekanisms gruppen) för att nå specifikt syfte (som inte kan uppnås på något annat sätt), bl.a.:

1) för att validera att enskilda centrala mekanismer protokoll (åtgärd 6-9) är reproducerbara för genetiskt spårande av celler. Detta görs genom att exponera samma djur för samma "centrala mekanism" åtgärd två gånger (maximalt). Vi kan genom detta kontrollera att samma celler/cellpopulationer spåras med båda händelserna. Om inte samma celler aktiveras/spåras vid samma karaktär av stimuli, fungerar inte experimentet och det finns isåfall ingen mening att använda den aktuella modellen enligt 3R-principen.

2) för att undersöka hur mycket av cellpopulationer som är involverad i och spåras av olika centrala mekanismsåtgärder (åtgärd 6-9) överlappar med varandra. Det är viktigt för att tolka resultat. T.ex. kan vår sömnbrist åtgärd aktivera delvis samma celler som vid stress åtgärd. Vi behöver därför att utsätta samma djur för två olika "centrala mekanismer" åtgärder och kontrollera hur mycket spårande cellpopulationer överlappar.

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

1) Se beskrivning av centrala mekanismer åtgärder ovan (6-9) för vad som görs för att minska djurets lidande i individuell behandling.

2) Applicering av två centrala mekanismer på samma djur utförs efter individuella åtgärder optimeras (på olika djur)

- 3) Två centrala mekanismer åtgärder utförs på ett begränsat antal djur (max 150).
- 4) Djur som utsätts för två centrala mekanismer handlingar exponeras inte för några kroniska smärtmodeller (dvs används inte i nästa försöksgrupp).
- 5) Djur som ingår i denna åtgärd påverkas starkare negativt än andra djur i detta försök. För att minimera denna påverkan introducerar vi ytterligare begränsningar för andra procedurer som kan utföras på dessa djur. Detta kan också ses på flödesschema (Bilaga 1) samt tabell som visar maximalt antal "besvärlig" procedur i olika försöksgrupper/variant (se bilaga, "variant II"): maximala sensoriska test - 22 (vs 45 för andra djur i denna försöksgrupp, variant I), maximala test dagar - 6 (vs 10 för andra djur i detta försöksgrupp, variant I). Variant II utförs på ett mycket färre djur (max 200) än variant I.

4.2.1.2 Svårhetsgrad och avbrytningspunkt

Svårhetsgrad: Avsevärd

Beskrivning av avbrytningspunkten

Djuren avlivas om de når 0,4 på en enskild parameter med undantag:

- * störning av kroppsrörelse (på grund av att djuren förväntas kunna få en hälsa efter operations alt kemiskt känslighet testning);
- * diarrhea under 2 timmar efter opioid antagonist injektion.

Djuren avlivas med totalt poängtal överstiger 0,8 (kroppsrörelse ingår) med följande undantag:

- * under 2 timmar efter opioid antagonist injektion är avbrytningspunkt 1.2 (inkl alla parametrar).

4.2.1.3 Efter försöket

Avlivningsmetod: Koldioxid

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

Djuren placeras i en genomskinlig bur. Koldioxidhalten höjs därefter successivt.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Kontroll att cirkulationen har upphört
- Kontroll att rigor mortis har inträtt
- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Halsdislokation

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

Djuret hålls i svansen och nacken fixeras. En snabb ryck i svansen utförs som bryter djurets nacke. Proceduren utförs i både bedövade och vakna djur.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Avblodning av medvetslösa djur

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

Djuren är satt under narkos, thorax öppnas och hjärtat är exponerat. systemet töms på blod genom injicering i hjärtat av PBS buffert (eller liknade). Efter det injiceras fixeringslösning (t.ex 4% PFA i PBS), annan eller annan lösning om ofixerad vävnad är önskad.

Bedövningsmetod

Narkosmedel

Beskrivning av bedövningsmetoden

Isofluran (3-5%) eller injektionsanestesi (medetomidin+ketamin, xylazin+ketamin eller pentobarbital).

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Avblodning

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

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.

Några djur ska också skickas till våra kollegor i EU, framför allt Tyskland. De har unik metod för att mäta egenskaper av individuella nervändar i hud (utförs på vävnadsexplantat från döda djur). Vi skickar levande mus efter veterinärer har bekräftat att djurens kondition och hälsa tillåter detta. Vi kommer behöva skicka mindre än 5% av våra experimentella djur till kollegor i EU. Mottagarna i EU har försöksdjuretiskt tillstånd i enlighet med nationella lagstiftning. Djur utsätts för måttlig stress under transport, vilken hålls så kort som det går.

Djuren ingår i andra grupper i denna ansökan

Beskrivning av vilken/vilka övriga grupper djuren kommer att ingå i.

Några djur i denna grupp ingår också i försöksgrupp "Avel och gemensamma procedur".

4.3 Försöksgrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta

4.3.1 Undergrupp: Centrala mekanismer i kronisk smärta

I denna grupp beskriver vi procedurer och experimentflöden för att studera hur specifika nervceller populationer i hjärnan modulerar normal känslighet. För att kunna selektivt manipulera neuroner i hjärnan som aktiveras av olika djurupplevelse (som t.ex. fysisk aktivitet, kronisk stress eller opioidabstinens), måste vi utsätta djur för dessa upplevelser. Detta viktiga steg behövs för s.k. genetisk spårning som antingen märker sådana celler eller gör dem mottagliga för funktionell modulering (till exempel inaktivering).

Angiven siffra är en uppskattning och kan komma att ändras något.

Mus (Mus musculus), 1000 st, Försöksdjursanläggning

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

Se Försöksgrupp Avel, 4.1.1, beskrivning av ras.

Djur som används i denna undergrupp är en del av djuren i försöksgrupp 4.1.

Max ensamhållning för detta grupp 4 månader för RA modell and 2 månader for nervskada modell.

Alt tillsyn beskrivas i åtgärder i denna grupp är extra tillsyn som vanligtvis utförs av forsarna.

Genetiskt modifierade djur används: Ja

Diarienummer på tillstånd samt beskrivning och motivering av metoder.

se försöksgrupp 1

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

Åtgärd 1: Systemisk AAV

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi kommer behöva administrera AAV virus systemiskt till neonatal (via i.p eller i.v) eller till vuxna möss (iv: svans, temporal eller annan ven, max 200 ul) som visat sig vara effektiv för uttryck av gener i det centrala och perifera nervsystemet, inklusive sensoriska neuroner av dorsal rots gangliet (DRG).

Detta utförs emedan djuret är under anestesi. För detaljerad beskrivning, se ovan försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd 1. Denna åtgärd utförs en gång per djur.

Denna åtgärd har mild svårighetsgrad.

Djur kommer att uppleva besvär i samband med injektionen. Virus orsakar inga symptom. När ungarna förflyttas från buren kommer modern att uppleva stress.

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

Vi studerar rollen av specifika gener involverade i smärtmekanismer. För detta behöver vi modifiera uttryck av de specifika gener eller introducera gener som gör att man kan styra aktiviteten hos neuron. Systemisk AAV-infektion är enkel, effektiv och den minst invasiva metoden för att göra detta.

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

För vuxna djur appliceras smärtstillande kräm på svansen 15-30 minuter före i.v. När ungarna förflyttas från buren kommer modern att uppleva stress. För att minimera denna effekt, behandlas endast max hälften av ungarna åt gången och resterande är kvar i boet. Efter att den första uppsättningen av injektioner är klar, sätts de injicerade nyfödda ungarna tillbaka i buren och de återstående ungarna överförs till värmeplattan för AAV administration.

Åtgärd 2: Leverans av ämnen

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi behöver leverera olika ämnen med, bl.a. följande syfte: i) aktivera specifik rekombination eller specifikt genuttryck; ii) i samband med sensoriska test modifiera olika signalvägar för att studera hur de bidrar till sensorisk känslighet (agonister och antagonister); iii) utföra kronisk modifiering av olika signalvägar för att studera hur de bidrar till sensorisk känslighet på lång sikt.

Under hela experimentet utförs maximalt 35 injektioner för varje enskilt djur, varav max: 20 st i.p (max volym 0.5 ml per injektion), 25 st p.o. (max volym 0.3 ml per injektion), 25 s.c. (max volym 0.25 ml) eller 3 intratekal (max volym 5 ul per injektion).

Om det anses lämpligt kan serier av injektioner ovan ersättas med en minipump installation (i.v. eller intracerebral; Alzet eller liknande).

För detaljerad beskrivning av åtgärden, listan av ämnen, deras maximala dos och annat info, se försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd 2.

Djur kommer att uppleva mindre stress och obehag i samband med administrering av ämnena eller miniosmotisk pump installationen.

Denna åtgärd (en serie) har mild svårighet, oberoende av typ antal repetition (max 7) och leverans väg.

För motivation – se försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd 2 (beskrivning av hur djuret kommer att påverkas av åtgärden)

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

Kontroll av genuttryck med syntetiska ämnen är en av de mest kraftfulla metoder att studera funktionen av olika gener och celltyper för kroppens fysiologi och patofysiologi, inkluderande kronisk smärta. Leverans av aktivering/hämning ämne utförs för att studera roller av signalvägar i olika smärtmekanismer.

Injicering i tassen (i.pl) behövs för att studera lokala mekanismer i tassen inkl. signalering mellan cellerna som kontrollerar känslighet i huden.

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

Proceduren utförs av utbildad personal. Den minst invasiva metoden för administrering som tillåter att målet för experimentet uppfylls kommer att användas. När upprepade i.p och s.c. injektioner utförs varierar injektionsplatsen på samma djur för att undvika inflammation/irritation. I.t. injektion utförs under narkos.

Om ip administrering sker upprepade gånger så palperas buken före varje administrering. Möss med peritonit avlivas.

Åtgärd 3: Sensoriska beteende test och sensorisk stimulering

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

För att undersöka hur djuret svarar på olika sensoriska modaliteter (olika typer av känsel som t.ex värme, kyla, mekanisk osv) kommer olika sensoriska test att utföras.

För detaljerad beskrivning av sensoriska test utföras och kombineras se ovan, försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd 3. Normalt maximalt 5 test utföras per dag.

Maximalt test, av de avsevärda och testning dagar per djur i denna försöksgrupp (”N tester/N avsevärda test/N testning dagar”, se Bilaga 1, sida 2):

Nervskada modell om ej kombineras med "central mekanism" åtgärder – 60/12/25

Nervskada modell om kombineras med "central mekanism" åtgärder - 30/5/13

Reumatoid artrit modell om ej kombineras ej med "central mekanism" åtgärder – 45/12/22,

Reumatoid artrit modell om kombineras med "central mekanism" åtgärder - 30/5/13,

Så många maximal dagar/test för kronisk smärt modell krävs för etablera hur modellen (ändring i sensorisk känslighet) utvecklas över tid. Sådant experiment kombineras aldrig med en ”central mekanism” åtgärd på samma djur. När modell etableras blir de normalt inte mer än 30 test under mindre än 13 test dagar och kommer att kombineras med en ”centrala mekanismer” åtgärd.

Under maximalt tre dagar kommer sensoriska test kombineras med leverans av ämne (agonister och antagonister) för att studera vilka signalvägar bidrag till sensorisk känslighet (åtgärd 2 av denna undergrupp). Vid det tre dagarna som ämnen administreras kan maximalt 6 sensoriska test utföras istället för 5 (utföras på max 5% av djur). Typiska test inkluderar 3 test innan ämnet administreras och tre test efter att ämnet administrerats. Den totala tiden djuret är i experiment är oförändrat. Djuren kommer maximalt att vara i experiment för att testa sensorisk känslighet under 8 timmar per dag, inklusive habituering. Den största tiden under försöket kommer djuret att vänta på sin tur att stimuleras. Vid några dagar (maximalt tre per djur) kan kombinationer av sensoriska test ersättas med en sensorisk stimulering. Sensorisk stimulering är en applicering av en specifik stimulus. Ingen av

sensoriska stimuli kombineras med andra sensoriska simulationer eller sensoriska test under samma dag.

Sensorisk test/stimulering kan komma att kombineras med optogenetisk stimulering (LED-ljus). 16 test som vi kommer använda är (detaljerad beskrivning se ovan, försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd 3):

1. Kemisk känslighet testning (svårighetsgrad: avsevärd)
2. Plats preferens (ringa)
3. Randall-Selitto Paw Pressure test (måttlig)
4. Pressure Application Measurement (PAM) (måttlig)
5. Radiant heat (inklusive Hargreaves test) (mild)
6. Icke smärtsamt aceton test (mild)
7. Rotarod (måttlig) 8. Balktest (mild)
9. Openfield (ringa)
10. Pinprick (mild)
11. von Frey (mild)
12. Pensel test (mild)
13. Tröskeln för termiskt obehag (måttlig)
14. Hot/Cold plate (måttlig)
15. Kylsmärttest (avsevärd)
16. Kläm test (måttlig)

Under en dag med sensoriska test kan samma djur få maximalt en avsevärd och 2 måttliga test.

Klassificering av svårighetsgrad av sensoriska test och hur djuret påverkas - se ovan, försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd 3.

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

Se ovan, försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd 3.

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

Se ovan, försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd 3.

Undantag

- Söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Motivering: Djur kan inte ges smärtstillande behandling eftersom studerar vi smärta och behöver mäta känslighetströskel.

Åtgärd 4: Rutiner under kirurgiska ingrepp

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Denna åtgärd beskriver allmän praxis som vi använder för olika kirurgiska ingrepp. Beskrivning av specifika kirurgiska ingrepp ges nedan i denna försöksgrupp. För alla kirurgiska ingrepp kan alternativ anestesi eller smärtlindring ges vid behov efter rekommendation av veterinär.

*** UNDER INGREPP**

Under narkos (längre än 15 minuter) ligger musen på en varm dyna (ej i samband med avlivning). Om narkos varar i mer än 45 min ges 0,25 ml steril saltlösning s.c. Därefter ges steril saltlösning (ca 0,25) var 45 min av narkos. Detta kan utföras med nålen som sitter kvar sc under hela ingrepp och riktas om mellan injektioner. Narkos kommer inte att användas under en längre tid än 3 h. Ögonsalva appliceras för att förhindra korneal uttorkning under narkos om det fortsätter längre än 5 minuter (dock ej i samband med avlivning).

*** EFTER INGREPP**

För alla kirurgiska ingrepp kan det bli nödvändigt att söva djuren samt att sätta nya suturer utifall att någon sutur skulle gå upp.

Smärtstillande injektion ges sc.

I vissa situationer kommer vi lägga djur under narkos innan vi utför ip eller sc-injektion (inklusive smärtstillande medel). Narkos kan vara att föredra när injektion utförs på nyligen opererade djur, särskilt efter i.sp eller i.cr. T.ex. när i.p eller s.c utförs på vakna djur, hålls det med rygghudgrepp vilket kan innebära störning av det senaste kirurgiska såret. Detta kan resultera i onödigt djurlidande, längre sårhäkning och ökad variation mellan djur.

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

Kirurgi är nödvändigt för olika anatomiska manipulationer, till exempel applicering av leveransvirus eller andra spårningsföreningar till olika anatomiska strukturer.

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

Denna åtgärd beskriver allmän praxis för kirurgiska ingrepp och det mesta syftar till att minska djurens lidande.

Kirurgiska ingrepp kommer att utföras under anestesi. För att minimera risken för infektioner i samband med ingreppet kommer aseptisk teknik och sterila instrument att användas. För alla kirurgiska ingrepp ges smärtlindring vid behov efter rekommendation av veterinär.

Åtgärd 5: Spårningsämne leverans till nervsystem

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi kommer att administrera AAV, Rhabdovirus, Lentivirus, HSV, annat virus eller spårningsämne till nervsystem. Detta kan utföras som intratekal injektion, i.t., (en injektion i subaraknoidutrymmet dvs i cerebrospinalvätskan, CSF, dvs. mellan ryggmärgen och inre ytan av ryggraden); intraspinal injektion (dvs. injektion i ryggmärgen), i.sp. och/eller som , injektion i hjärnan (intrakraniell injektion, i.cr.) eller deras kombination. Tidpunkten för åtgärden kan skilja sig mellan djuren men detta påverkar inte djurens välbefinnande.

Detaljerad beskrivning (inkl. hur djuret kommer att påverkas) ges ovan i försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd 5 ("Spårningsämne leverans till nervsystem").

På de flesta djur kommer bara ett ingrepp av tre nämnd ovan utföras och detta klasseras som måttligt experiment. På några djur kommer vi att kombinera maximal två ingrepp (t.ex i.sp + i.cr; i.sp + i.sp eller i.cr + i.cr) med åtminstone en vecka intervall. Två injektion på samma djur är avsevärd (ska utföras i mindre än 10% av djur)

Djur upplever obehag och smärta i samband med anestesi och intraspinal injektion. Ämnena (inkl virus) i sig leder inte till förändring i djurens hälsa. #UD Bara Rhabdovirus leder till att några nerv cells dör och kan orsaka försämring av djurens hälsa.

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

Vi studerar rollen av specifika gener involverade i smärtmekanismer. För detta behöver vi leverera olika ämnen (framför allt virus) på ett effektivt sätt till specifika områden av nervsystemet. Två injektioner (intrakranial och intraspinal) krävs när en injektion inte räcker för att nå det experimentella syftet. Till exempel för att en specifik spårning av en cellgrupp i hjärnan (som har axoner i ryggmärg) kan vi behöva spåra denna grupp både lokalt (intrakranial injektion) och distalt (intraspinal injektion) med olika virus. I så fall markerar vi på högst specifikt sättet celler som uttrycker specifik gen (nås med intrakranial injektion) OCH skickar axoner till specifikt område av ryggmärg (nås med intraspinal injektion).

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

Injektionen kommer att utföras under anestesi. För att minimera risken för infektioner i samband med ingreppet kommer aseptisk teknik och sterila instrument att användas. Alla möss kommer att övervakas en gång om dagen för tecken på smärta. Djuret kontrolleras under 30 min efter injektion för uppenbar motorisk försämring. Extra tillsyn för i.cr och i.t. utförs åtminstone en gång nästa dag efter operation. För i.sp utförs extra tillsyn en gång varje dag (oftast av en forskare) av åtminstone två följande dagar efter ingrepp.

Karprofen kan ges i upp till tre dagar ytterligare om ett djur uttrycker tecken på smärta eller lokal inflammation.

För ytterligande detaljer av kirurgiskt ingrepp se ovan åtgärd ”Rutiner under kirurgiska ingrepp”. Mössen kommer att offras om de är förlamade till följd av operationen (detta kan hända efter i.sp, i.cr eller i.t; blir uppenbart direkt efter återhämtningen och händer bara i sällsynta fall) eller på något annat sätt när 0,4 på en enskild parameter). Avbrytningspunkt är 0.6 12 timmar efter kirurgiskt ingrepp.

Åtgärd 6: Spårning av perifera nätverk

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi kommer behöva spåra perifera nätverk med injektionen av virus eller annat spårning ämne som igenom hud. Tidpunkten för åtgärden kan skilja sig mellan djuren men detta påverkar inte djurens välbefinnande.

För att spåra, modifiera och aktivera nätverk av nervceller som finns i periferin kommer vi injicera spårnings ämnen (inklusive virus eller andra partiklar, bl.a. Flouoro-Gold, Neurobiotin, Lumafluore, Fast Blue, Cholera toxin B subunit, DiI, BrdU, EdU, 4OH-Tamoxifen, RU486) eller aktivitetsmodifierande ämnen (bl.a. CNO, lidokain) till hud (direkt på hud, topikalt, i.d. eller i.pl. (d.v.s in i trampdynan), inklusive dorsalt eller ventralt i tassen, maxvolym 25 ul), muskler (max 30 ul), led (knä, max 10 ul), juvervävnad (max 3 ul). Max tre injektioner i olika platser på djurets kropp kommer ges. Djuren sövs (isofluran) inför injektionen. Smärtlindring ges i samband med operation. Om flera injektioner ges i samma organ (samma muskel, samma led, osv.), används samma totala maxvolym per organ som ovan d.v.s. den individuella injektionens volym minskas.

Ämne utan förväntad stimulering av smärta, klåda eller liknande (t.ex. lidokain, CNO, 4OH-Tamoxifen eller annat som kan användas med syfte av spårning) kan appliceras på hud som lösning, kräm eller plåster. Max hudyta för kräm/plåster applicering är 6 kv.cm. Applicering kan utföras efter att huden rakats (rakning kan utföras utan att ett ämne appliceras, som kontroll). Maximalt behöver vi att inaktivera/aktivera nervbanor under 10 dagar. Vi hoppas att nå detta med kräm applikation max två gånger per dag för lidokain, en gång per dag för andra ämne eller plåster applikation en gång per dag. Kräm kan blandas med ett bittert ämne (t.ex denatonium benzoate) som inte har någon negativ effekt på

djur för att minimera risken att djur inmundigar krämen. Plåster borttagning kan utföras under narkos. Experiment avslutas om djur når 0.4p på parameter "hud" av KI-mall.

All injektion i huden (utom s.c. på ryggskinnet) utförs på bedövade djur. Oftast utförs injektion i tassan (i.pl.), men det kommer behöva göras i annan hud också. Tassinjektionen utförs på följande sätt: nålen riktas längs tassans mittlinje för ett avstånd av 6 mm i fårens riktning och i en vinkel på ca 5 grader i tassytan. Nålpunkten ska vara avskuren nedåt. Injektionen utförs långsamt och kan följas av en kort mild massage av plantarregionen med ett finger för att lösningen ska distribueras bra i vävnaden. Nålen får stanna på plats i upp till 20 sekunder och dras sedan tillbaka.

Djur kommer att uppleva mindre besvär i samband med injektion och narkos. Inget av ämnen vi kommer att använda påverkar djurens välbefinnande. Denna åtgärd har mild svårighetsgrad.

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

Sensoriska neuroner har både hudinnervering och innervering av inre organ. För att se hur neuroner med olika perifera mål påverkas i olika smärtmodeller (till exempel molekylärt (genuttryck) eller anatomiskt (ändring i central eller perifer innervering)) måste vi spåra neuroner med specifik perifer innervation. Detta uppnås genom att injicera spårämnen i innerveringsvävnaden. Det finns ingen annan metod som vi kan använda att förstå vilka perifera neuron som innerverar de olika organen. Vi behöver injicera på upp till tre ställen per djur för att studera om nervceller som innerverar de olika organ påverkas på samma eller olika sätt efter specifika stimuli, till exempel centrala mekanismer aktivering.

Djur påverkas minimalt av topikal behandling. Topikal administrering kräver i vissa situation, t.ex för att behandling når endast hudens celler/nervändelser. Gavage leder till systemisk administrering och alla tamoxifenet når alla celler.

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

Alla injektioner (utan s.c.) kommer att utföras under narkos.

Åtgärd 7: Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala populationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för smärtekänslighet. Detta kan utföras genom farmakologisk intervention eller att exponera djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa neuron. Denna åtgärd är en bland grupp av alternativa åtgärder (kallades "centrala mekanismer") som aktiverar specifik cell population i hjärnan.

Centrala mekanismer, alternative procedurer:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande (denna åtgärd);

Åtgärd: Pågående stress;

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet; Åtgärd: Sömnbrist;

Detta betyder att bara en av dessa åtgärder utförs på en och samma djur i denna försöksgrupp.

Kortfattat, utsätts djur för en serie av opioid receptor agonist och antagonist för att nå ett akut abstinensbesvär. Detaljerad beskrivning av åtgärd (inkl påverkan av djur) ges i försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd "Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande".

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

Se försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd "Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande".

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

Djuren kommer att observeras under hela 60-90 minuter testperioden efter administrering av opioid antagonist. Efter testperiod kommer djuren att observeras minst en gång per dag under upp till 4 dagar.

Åtgärd 8: Centrala mekanismer: pågående stress

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala populationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för smärtekänslighet. Detta kan utföras genom farmakologisk intervention eller att exponera djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa neuron. Denna åtgärd är en bland grupp av alternativa åtgärder (kallades "centrala mekanismer") som aktiverar specifika cellpopulationer i hjärnan.

Centrala mekanismer, alternativa procedurer:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande (denna åtgärd);

Åtgärd: Pågående stress;

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet;

Åtgärd: Sömnbrist;

Detta betyder att bara en av dessa åtgärder utförs på en och samma djur i denna försöksgrupp.

Pågående stress utförs genom en av två alternativa metoder: 1) Immobilisering, 2) Simningstestet. Detaljerad beskrivning av åtgärd (inkl påverkan av djur) ges i försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd "Centrala mekanismer: pågående stress". Denna åtgärd är avsevärd.

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

Denna åtgärd är en av flera åtgärder från gruppen "centrala mekanism", ett centralt moment av hela denna studie. Se försöksgrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, undergrupp ”Centrala mekanismer i normal känslighet”, åtgärd "Centrala mekanismer: pågående stress".

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

Behållare för immobilisering är av det slag som ger god ventilation och av en storlek som inte är mindre än vad som krävs för försöket. Vattnet för simtestet är av rumstemperatur, eller något högre.

Åtgärd 9: Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala populationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för smärtekänslighet. Detta kan utföras genom farmakologisk intervention eller att exponera djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa neuron. Denna åtgärd är en bland grupp av alternativa åtgärder (kallades "centrala mekanismer") som aktiverar specifika cellpopulationer i hjärnan.

Centrala mekanismer, alternativa procedurer:

Åtgärd: Opioidtillbakadragande;

Åtgärd: Pågående stress;

Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet (denna åtgärd);

Åtgärd: Sömnbrist;

Detta betyder att bara en av dessa åtgärder utförs på en och samma djur i denna försöksgrupp.

Kortfattat, placeras mössen på ett motionshjul vid låg hastighet (ej mer än 5 cm/s) under 12 timmar. Proceduren utförs max 7 gånger, max en gång per dag. Detaljerad beskrivning av åtgärd (inkl påverkan av djur) ges i försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd "Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet".

Denna åtgärd är av måttlig svårighetsgrad.

Djur kan uppleva besvär i samband med procedur till exempel tvingad fysisk aktivitet och inte förlänga avbrott i tillgången till mat och vatten. Djur kan också uppleva stress i samband med elektriska stötar.

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

Se försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd "Centrala mekanismer: pågående fysisk aktivitet".

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

Motionshjul används som max under två dagar i rad.

Under försöket monitoreras djuren hela tiden. Efter försöket examineras djuren en gång per dag under 2 dagar för att säkerställa att de inte minskat i vikt och att dom har ett normalt beteende inkl gromning som tyder på varaktig stress.

Utföraren av försöken kommer att vara i rummet under hela proceduren och kommer att kolla att djuren är okey varje 5 min. Om utföraren av försöket måste lämna rummet mer än 10 min kommer djuren att placeras tillbaka i sina burar.

Djuren kommer att under 5 minuter varje 3 timmar föras över till hemburen med tillgång till mat och vatten. Detta görs för att mössen har tillgång till vatten och mat för att undvika dehydrering och/eller stress.

Åtgärd 10: Centrala mekanismer: sömnbrist

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi måste kunna aktivera eller inhibera olika neuronala populationer i centrala nervsystemet för att studera deras roll för smärtekänslighet. Detta kan utföras genom farmakologisk intervention eller att exponera djuren för beteendeprocedurer som aktiverar dessa neuron. Denna åtgärd är en bland grupp av alternativa åtgärder (kallades "centrala mekanismer") som aktiverar specifika cellpopulationer i hjärnan.

Centrala mekanismer, alternativa procedurer:

Åtgärd: Opioid tillbakadragande ;
 Åtgärd: Pågående stress;
 Åtgärd: Pågående fysisk aktivitet;
 Åtgärd: Sömnbrist (denna åtgärd);

Detta betyder att bara en av dessa åtgärder utförs på en och samma djur i denna försöksgrupp.

Kortfattat, placeras mössen på ett motionshjul vid låg hastighet (ej mer än 5 cm/s) under max 12 timmar under dagtid. Proceduren utförs max 7 gånger, max en gång per dag. Detaljerad beskrivning av åtgärd (inkl påverkan av djur) ges i försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd "Centrala mekanismer: sömnbrist".

Denna åtgärd är av avsevärd svårighetsgrad.

Djur kan uppleva besvär i samband med procedur framförallt sömnbrist med också i med tvingad fysisk aktivitet, och korttids uppehåll i tillgången till mat och vatten. Djur kan också uppleva stress i samband med elektriska stötar.

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

Se försöksgrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", undergrupp "Centrala mekanismer i normal känslighet", åtgärd "Centrala mekanismer: sömnbrist".

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

Motionshjul används som max under två dagar i rad.

Under försöket monitoreras djuren hela tiden. Efter försöket examineras djuren en gång per dag under 2-3 dagar för att säkerställa att de inte minskat i vikt och att dom har ett normalt beteende inkl grooming som tyder på varaktig stress.

Utföraren av försöken kommer att vara i rummet under hela procedur och kommer att kolla att djuren är okey varje 5 min.

Djuren kommer att under 5 minuter varje 3 timmar föras över till hemburen med tillgång till mat och vatten. Detta göra att mössen har tillgång till vatten och mat för att undvika dehydrering och/eller stress.

Åtgärd 11: Smärta modell: Reumatoid artrit

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi ska studera vilken roll olika neuronala populationer i centrala nervsystemet har i kronisk smärta och om underliggande mekanismer kan används för att behandla kronisk smärta eller förebygga utveckling av dessa. För att utföra detta kommer vi behöva två alternativ modell för kronisk smärta:

1) Nervskada (SNI) 2) Reumatoid artrit

Djur kan utsätts endast till en av dessa åtgärder, som utförs alltid efter "central mekanism" åtgärd.

Reumatoid artrit (RA) modell utlöses. Detta utlöses via i.v. injektioner av antikroppar (enstaka eller en blandning av flera olika antikroppar; maxvolym per injektion – 150 ul; volymen som överstiger 125 ul (d.v.s. mellan 125 och 150 ul) injiceras långsamt, som en infusion). Upp till fyra injektioner (en gång per dag) utförs med 1-5 dagars intervall. För att öka inflammationen genomförs separata i.p. eller i.v. injektioner av lipopolysackarider (LPS; max 2 mg/kg; max total volym för i.p. 300 ul och för i.v. 200 ul). Detta görs en gång, 4 till 7 dagar efter sista antikroppsinjektion. Inflammationspoäng bedöms baserat på ledernas svullnad och rodnad; Clinical Arthritis Score (se Bas DB et al., Arthritis Rheum. 2012 Dec;64(12)): varje inflammerad (både svullen och röd) tå noteras som 1 poäng; om den dorsala delen av tass- eller fotled / twist-led är inflammerad, ges 2,5 poäng för måttlig inflammation och 5

poäng för svår inflammation, vilket resulterar i en totalpoäng mellan 0 och 15 för varje extremitet och högst 60 poäng per mus. Avbrytningspunkten för våra försök är 45 eller över 35 för längre än 18 dagar. Modell utveckling bedöms med Clinical Arthritis Score och sensoriska test. Smärtliknande beteende ska bedömas tidigast dagen efter antikroppar injektionen med 2 till 4 dagars intervall men inte mer än 25 gånger per djur. Ingen smärtliknande beteende testas för tre dagar efter LPS injektionen. Djuren kommer att avlivas senast 8 månader efter första tecken på modellutveckling (ökad känslighet). Så lång tid krävs för att studera sensorisk överkänslighet (observerad i RA-modellen under inflammationsfasen men varar mycket längre efter att den inflammatoriska fasen slutförts) och hur detta kan återställas. Av detta skäl måste vi hålla djur i något försök i huvudsak längre än andra laboratorier som är intresserade av modellens inflammatoriska fas.

Denna åtgärd har avsevärd svårighetsgrad.

Djuren kommer att uppleva besvär i samband med ip eller iv injektion. Åtgärden resulterar i 3-5 veckors ledinflammation vilket kommer att orsaka smärta. Möss kommer att visa ledinflammation från första dag efter LPS-injektionen, som når maximum ca 8-10 dagar senare. Inflammationen kommer att vara kvar 3-5 veckor. Efter induktion av artrit är musen fritt rörlig och den framkallade smärt-liknande beteende håller sig kvar under några veckor efteråt, efter inflammation att gått ner. LPS-injektion orsakar feberliknande symtom med något påverkat allmänt tillstånd, piloerektion och kroppshållning den första dagen efter LPS-injektionen. På grund av detta höjs avbrytningspunkten till 1.2 under 48 timmar efter LPS injektion. Djur återhämtar sig vanligtvis inom 48 timmar.

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

Vi behöver använda denna modell för att komplettera information från experiment med andra kronisk smärtmodell, SNI, i vår komparativa smärtstudie. Denna RA-modell är väletablerad och karakteriserad och det mesta relaterar till human RA.

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

Under 48 timmar efter LPS-injektionen kommer våt mat att tillhandahållas på golvet i buren. Lokal smärtstillande kräm tillhandahålls på svansen 15-30 minuter före i.v. injektion för att lindra smärta inducerad genom injektion. Djuren kontrolleras 1-2 timmar efter LPS-injektion för allmänt tillstånd och även tecken på nöd dagligen under 3 dagar. Senare kontrolleras djuren varannan dag tills de tecknen av inflammation i tassar försvinner (ca 3 veckor)

Undantag

- Söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Motivering: Djur kan inte ges smärtstillande behandling eftersom vi behöver mäta känslighetströskel.

Åtgärd 12: Smärta modell: Nervskada

Ingående beskrivning av åtgärden och hur djuret kommer att påverkas

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

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

Vi ska studera vilken roll olika neuronala populationer i centrala nervsystemet har vid kronisk smärta och om underliggande mekanismer kan användas för behandla kronisk smärta eller förebygga utveckling av dessa. För att utföra detta vi kommer behöva två alternativ modell för kronisk smärta: 1) Nervskada (SNI) 2) Reumatoid artrit.

Detta betyder att varje djur blir exponerad endast för en av dessa procedurer, som utförs alltid efter

"centrala mekanismer" åtgärd.

Nervskada på ischiasnerven kan utföras som fullständig (axotomi), partiell (spared nerve injury, SNI) tvärsnitt eller nervligatur (partiell - spinalnerv ligation, SNL, fullständig - chronic constriction injury, CCI). I de flesta fall utförs det ensidigt. I mycket sällsynta fall behöver vi utföra proceduren bilateralt. (Motivering för bilateralt: vid sällsynta tillfällen är antalet neuron som påverkas av stor betydelse och fler neuron påverkas vid bilateral än unilateral, som tex vid sortering av påverkade neuron för RNA sekvensering. Det kommer också resultera i att mer än två gånger färre djur används totalt sett). Både partiell nervskada (SNI) och axotomi utförs under anestesi med isofluran. Huden rakas och desinfekteras, därefter läggs ett snitt genom huden på mitten av låret på vänster sida. Tre terminala grenar av ischiasnerven (common peroneala, tibiala och sural nerver) exponeras. En, två (mest vanlig) eller alla tre nerverna snörs tätt ihop med silkesuturer (alt Supramid), skärs av distalt till avsnörningen och 1-2 mm av nerven avlägsnas från distalstubben. För SNL modell läggs sutursilke runt nerven i mitten av låret. Kontakt med eller sträckning av den intakta nerven undvikas under den kirurgiska proceduren. Slutligen sys separat muskler med silkesuturer (alt Vicryl) och hud silkesuturer (alt Supramid).

Axotomi utförs på bakbenet. Ischiasnerven skärs av mitt på låret och 5 mm av den distala delen avlägsnas för att förhindra återväxt; sedan stängs muskeln och huden på samma sätt.

Bluff-operation innefattar nervavsnörning, men inte avskärning. Vi behöver också injicera spårämne (inkl. virus) eller aktivitetsmodifierande ämne i ischiasnerven eller dess gren(ar) (max volym 3 ul). Detta kan utföras på intakt nervbana eller i samband med dess borttagning/skada.

Bluff eller avskärning operation kan kopplas med "nerv block". Detta utförs som implantation av material ("beads" eller "ark") som placeras runt/bredvid nerv och befria långsam lidokain eller annat bedövning ämne.

Mössen behålls upp till 3 månader efter nervskada operation.

För att nå experimentets syfte måste smärtnervbanorna vara aktiva och smärtstillande medel kan inte användas på samma sätt som efter andra kirurgiska ingrepp. Mot bakgrund av detta ska vi använda ett av två alternativa smärtlindring: en systemiskt smärtstillande injektion innan ingrepp eller lokalbedövning i hud/muskellager efter ingrepp.

Denna åtgärd har måttlig svårighetsgrad.

Djur kommer att uppleva obehag och smärta i samband med kirurgiska ingrepp. Obehag förekommer också från förhöjd känslighet orsakad av smärta modellen, som kan fortgå hela perioden efter att smärtmodellen inducerats.

I alla nervskada modeller skadas vissa nerver på något speciellt sätt under kirurgiska ingreppet. Vid SNI (spared nerve injury, som vi nu mestadels använder) skärs två av tre grenar av ischiasnerven av (under narkos).

Nervskade proceduren är inte mer smärtsamt än något annat ingrepp där huden/muskler skärs.

Självklart att i det ögonblicket när nerven skärs, aktiveras axoner massivt, så det måste vara ett smärtsamt moment. Men detta ögonblick inträffar alltid när djuret är under narkos. När djuret vaknar upp efter operationen känner djuret inte någon starkare smärta än efter andra typ av operation. Djur som går igenom nervskada och simulerad operation bör ha samma smärtnivå resulterande från lokal vävnads intrång (skär hud/ muskler för att få tillgång till nerv). Tvärtom, djur med genomskurna nerver saknar känsel (inklusive eventuell smärta) som skall utföras av den nerven. Det finns alltså ingen anledning att tro att djur med genomskurna nerver uppleva mer smärta än kontroldjuren.

Skillnaden i känslighet mellan djur med skadad nerv och kontroldjur är inte omedelbar, men tar flera dagar att utveckla. Mer information: två grenar av ischiasnerven skärs av och från dem kommer ingen sensation. Men om operationen var framgångsrik, då utförs signalen av axoner i den tredje grenen (skonas, konserverade) som ger starkare känsla än det borde under normala förhållanden. Denna typ av ökad känslighet är orsakad av fenomenet neuropatisk smärta. Det tar vanligtvis 3 dagar för djur vars nerv skadas att uttrycka första tecknet till följd av operationen. Vanligtvis når effekten av ökad känslighet plåta i en vecka och stannar på den nivån i ett par veckor eller mer och sedan kan gå ner eller stå kvar.

Djur som utsätts till nervskada modell uttrycker inget tecken på spontan smärta. Även om operationen går fel (vanligtvis innebär det att den tredje grenen av ischiasnerven också påverkas), tappar djur helt känsla och uttrycker inte några tecken på ökad känslighet även om testad en vecka därefter. Det är ett vanligt problem för en oerfaren forskare: det är inte att djuret har mer ont, tvärtom, det visar inte några tecken av högre känslighet. ¶

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

Vi behöver använda denna smärtmodellen för studera den roll av olika neuronala populationer i centrala nervsystemet inblandad utveckling av kronisk smärta har för kronisk neuropatisk smärta. Dessa nervskade modeller är mycket etablerade och har bra reproducerbarhet. De beskrevs för ett par decennier sedan.

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

Narkos används under ingrepp. Kirurgiskt ingrepp utförs av kvalificerad personal.

Undantag

- Söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Motivering: Djur kan inte ges smärtstillande behandling eftersom vi behöver mäta känslighetströskel.

4.3.1.2 Svårhetsgrad och avbrytningspunkt

Svårhetsgrad: Avsevärd

Beskrivning av avbrytningspunkten

Djuren avlivas om de når 0,4 på en enskild parameter med undantag:

- * störning av kroppsrörelse (på grund av att djuren förväntas kunna få en hälsa efter operations alt kemiskt känslighet testning);
- * diarrhea under 2 timmar efter opioid antagonist injektion.

Djuren avlivas med totalt poängtal överstiger 0,8 (kroppsrörelse ingår) med följande undantag:

- * under 2 timmar efter opioid antagonist injektion är avbrytningspunkt 1.2 (inkl alla parametrar).
- * LPS-injektion (RA model) orsakar feberliknande symtom med något påverkat allmänt tillstånd, pilorfunktion och kroppshållning den första dagen efter LPS-injektionen. På grund av detta höjs avbrytningspunkten till 1.2 under 48 timmar efter LPS injektion.
- * När artrit utvecklats: score 45.
- * När artrit utvecklats: score >35 i 18 dagar.

4.3.1.3 Efter försöket

Avlivningsmetod: Koldioxid

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

Djuren placeras i en genomskinlig bur. Koldioxidhalten höjs därefter successivt.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Kontroll att cirkulationen har upphört
- Kontroll att rigor mortis har inträtt

- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Halsdislokation

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

Djuret hålls i svansen och nacken fixeras. En snabb ryck i svansen utförs som bryter djurets nacke. Proceduren utförs i både bedövade och vakna djur.

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Halsdislokation

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

Avlivningsmetod: Avblodning av medvetslösa djur

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

Djuren är satt under narkos, thorax öppnas och hjärtat är exponerat. systemet töms på blod genom injicering i hjärtat av PBS buffert (eller liknade). Efter det injiceras fixeringslösning (t.ex 4% PFA i PBS), annan eller annan lösning om ofixerad vävnad är önskad.

Bedövningsmetod

Narkosmedel

Beskrivning av bedövningsmetoden

Isofluran (3-5%) eller injektionsanestesi (medetomidin+ketamin, xylazin+ketamin eller pentobarbital).

Kontrollmetod för att säkerställa att djuret är dött

- Avblodning

Beskrivning av kontrollmetoden

Halsdislokation, upphörd cirkulation, avsaknad av vitala reflexer såsom cornealreflex eller rigor mortis.

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.

Några djur ska också skickas till vår kollegor i EU, framför allt Tyskland. De har unik metod för att mäta egenskaper av individuella nervändar i hud (utförs på vävnadsexplantat). Vi skickar levande mus efter veterinärs har bekräftat djurens bra kondition och hälsa. Vi kommer behöva skicka mindre än 5% av våra experimentella djur till kollegor i EU. Mottagarna i EU har försöksdjuretiskt tillstånd i enlighet med nationella lagstiftning. Djur utsätts till måttlig stress under transport vilket ska hållit kort.

Djuren ingår i andra grupper i denna ansökan

Beskrivning av vilken/vilka övriga grupper djuren kommer att ingå i.

Några djur i denna grupp ingår också i försöksgrupp "Avel och gemensamma procedur".

5 Undantag, sammanfattning

Söker undantag från Jordbruksverkets föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur (L150)

- Söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Titel

Centrala mekanismer i sensoriska nätverk som styr känsel och smärta

Sökord

smärta, sensoriska nervceller, ryggmärg, hjärnan, stress

Varaktighet

Försöket beräknas pågå till 2025-05-30

Använda djurarter

- Mus (*Mus musculus*), 14000 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 hälsa eller välfärd
- 8 Skydd av den naturliga miljön för att bevara djurs hälsa eller välfärd
- 9 Rättsmedicinska undersökningar
- 10 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.
- 11 Framställning och upprätthållande av en genetiskt modifierad djurstam
- 12 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 med försöket

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

Själva känslan av smärta finns i vår hjärna, även om smärtan upplevs som att vara i tex i våra muskler, leder eller ett sår i huden. Detta smärtsystem är livsviktigt och gör att vi kan skydda oss mot skada och också ta hand om befintliga skador så att kroppen kan läka. Tyvärr kan det gå fel i smärtbanorna vilket leder till obotlig kronisk smärta. Hjärnan har dock en mycket kraftig påverkan hur vi upplever smärta och hur mycket smärta vi känner. Det är tex ett välkänt faktum att sömn, stress, ångest, oro, upphetsning, trauma och neuropsykiatriska sjukdomar kan väsentligt påverka upplevelsen av smärta och denna påverkan har sitt ursprung i hjärnan. Syftet med dessa försök är hitta inblandade neuroner/cellkärnor i hjärnan och förstå hur de påverkar känslighet/smärta och hur kan dom används för att minska smärta.

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.

Runt 20% av befolkningen lider av kronisk smärta och ca 1/3 av dessa har så svåra smärtor att det påverkar deras liv avsevärt. Trots att kronisk smärta orsakar mycket lidande, saknas adekvata läkemedel för smärtlindring. De tillgängliga smärtlindrande läkemedlen har dålig effekt och fungerar bara på en del av de som lider av kronisk smärta. Det har inte tagits fram något konceptuellt nytt läkemedel för behandling av smärta på många årtionden. Genom att hitta dom nervceller som styr hur mycket smärta som hjärnan tillåter att vi känner, hoppas vi förklara varför smärta ökar vid samsjuklighet (komorbiditet) såsom ökad smärta vid undersövdhet, långvarig stress, ångest, oro, depression och andra neuropsykiatriska sjukdomar såväl som minskad vid tex kortvarig stress. Denna kunskap är viktig i sig och kan förklara vad som händer vid olika smärttillstånd och kan leda till att vi hittar markörer som gör att man kan mäta hur olika delar av detta system används i olika patienter/smärttillstånd. Kunskapen kan också hjälpa hitta helt nya vägar för att ta fram nya läkemedel mot kronisk smärta.

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.

Den centrala frågan i denna studie är hur olika nervcellsgrupper som aktiveras bl.a. av stress, sömnbrist, fysisk aktivitet i hjärnan kontrollerar smärtekänslighet och utveckling av kronisk. För att markera/manipulera dessa cellgrupper utsätts djur för motsvarande upplevelser (t.ex. stress, sömnbrist, fysisk aktivitet). De djurmodeller vi använder för att studera påverkan på hur hjärnan styr smärtekänslighet är väletablerade och beskrivna i litteraturen. För att studera/manipulera funktionen av specifika cell grupper roll för smärtupplevelse kommer vi att använda djur som är genmodifierade och/eller utsätts för olika standard procedurer, t.ex injektion i hjärnan och/eller i ryggmärgen. Detta har relativt mindre påverkan på djuren än vad själva modellerna för smärttillstånd har. Vi mäter bla hur sensorisk känslighet ändras över tid i dessa djur. I sådana experiment upplever djuren ett mindre obehag när sensoriska stimuli (värme, kyla, mekanisk) appliceras. I de flesta fall flyttar sig djuret från stimulus för att undvika obehag. I dessa försök uppstår obehag före smärta och djuren förväntas därför inte påverkas mycket. Vissa studier har det till och med visats att dessa sensoriska test kan vara underhållande för djuren om de utförs repetitivt, dvs då stress relaterat till försöket försvunnit. För att studera hur de nervcellpopulationer i hjärnan är iblandad i utveckling av kronisk smärta kommer vi utföra nervskade modellen som speglar vad som händer vid neuropatisk smärta, diabetes neuropati alternativt experimentell modell för reumatoid artrit. Den sistnämnda påverkar djur starkare och involverar några dagar av ledinflammation som är förknippade med en höjd känslighet i leder. Onödigt lidande för djuren kommer att undvikas i och med att vi har väldefinierade avbrytningspunkter. Efter avslutat försök, då antingen avbrytningspunkten eller slutpunkten har uppnåtts, kommer djuren att avlivas. Mindre än 5% av våra experimentella djur kommer att skickas till våra samarbetare i Tyskland. De har en unik metod för att mäta egenskaper av individuella nervändslut i huden (efter att djur har avlivats) och dessa försök är en betydande del av detta projekt. Vi skickar levande möss efter veterinärer har besiktigt djuren och bekräftat deras goda hälsa. Djur utsätts för måttlig stress under transport vilket kommer att hållas så kort som det är möjligt.

3R - Ersätta (Replace)

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

Mus är den optimala djurarten då det finns ett brett urval av stammar (liksom tekniker för att producera dessa) som tillåter användning av olika molekylära verktyg, såsom site-specifik rekombination (Cre,Dre etc.), knock-out, knock-in, optogenetisk och annan syntetisk aktivering av nervbanor mm. De olika upplevelse modellerna är bäst utvecklade och beskrivna i mus. De flesta tillgängliga beteende tester har utvecklats och optimerats för möss. Den patologiska processen som vi ska studera är ett komplext samspel mellan nervceller i periferi, ryggmärgen och hjärnan. Av detta skäl finns det för närvarande inget adekvat djur-fritt alternativ som reproducerar komplexiteten av detta system. Det går inte heller att studera effekten av komplexa upplevelser i djur-friamodeller. Det är också svårt att använda lägre evolutionära organismer eftersom vi försöker förklara orsakerna till onormal smärta hos människa.

3R - Begränsa (Reduce)

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

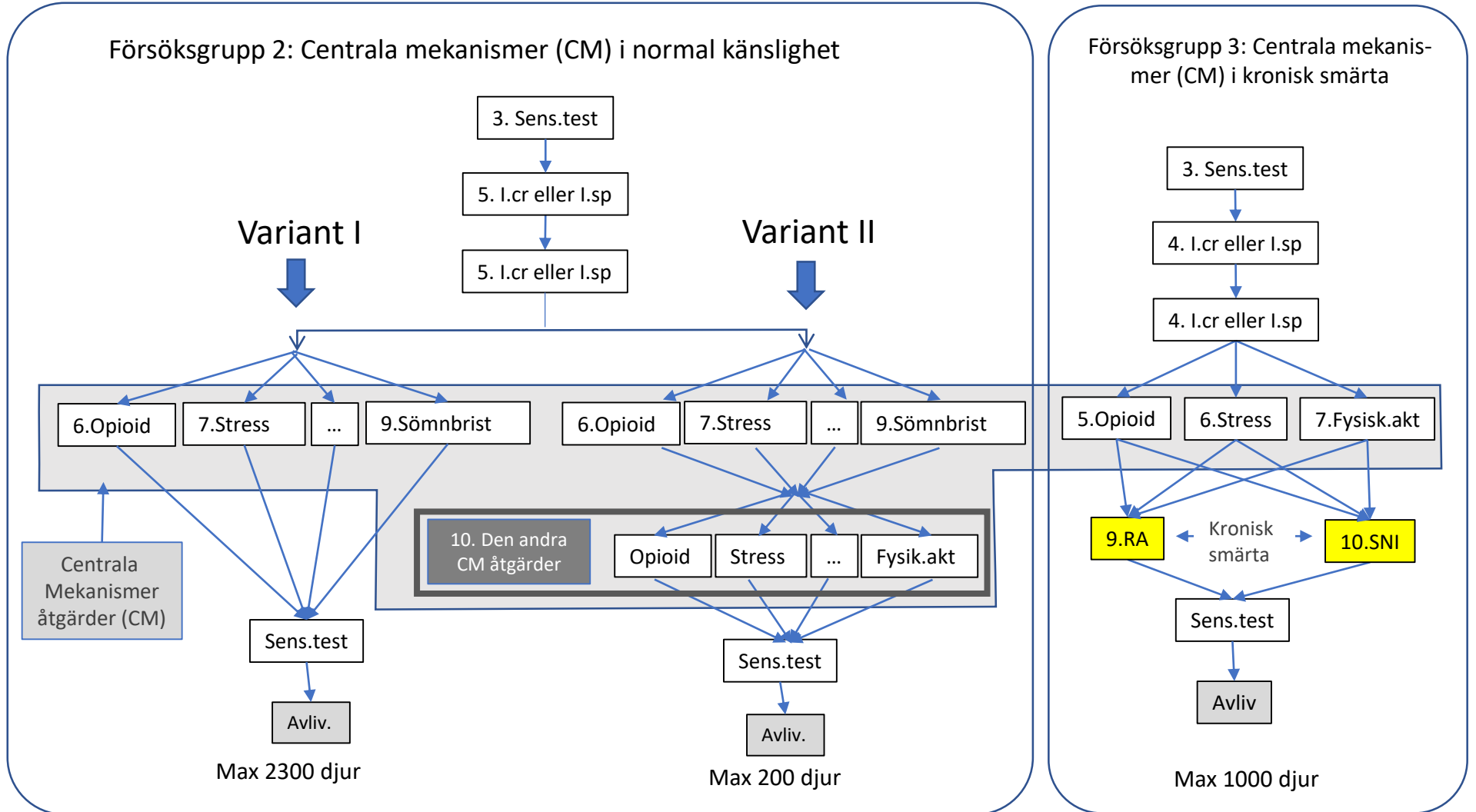
Vi använder väletablerade diabetes modeller som betyder att vi förhoppningsvis behöver ett litet antal djur för att optimera modellen. Vi utnyttjar också moderna, rationella och adekvata metoder som gör att vi kan svara på specifika frågor rörande mekanismer för kronisk smärta och som leder till hög experimentell reproducerbarhet. Detta säkerställer att färre djur används för att nå tillförlitliga slutsatser.

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.

Mus används eftersom genetiskt verktyg samt urval av modeller och procedurer är mycket väl utvecklade i denna art. Sålunda kommer användningen av denna art att markant reducera antalen djur i försök eftersom vi inte nämnvärt behöver utveckla metoder. Tillgängligheten av många olika musstammar gör att vi kan utföra exakta experiment för att svara på specifika frågeställningar. Upplevelse modellerna för kronisk smärta kommer att optimeras/valideras i ett mindre antal djur innan andra djur utsätts för dom. Narkos används under kirurgiskt ingrepp. Djur behandlas med smärtlindring då det är möjligt samt får lämplig tillsyn efter kirurgiskt ingrepp. Djur kommer att vänjas (habitueras) före beteende tester. När det är möjligt används mindre invasiva test och test som baseras på fri rörlighet hos djuren vilket markant minskar djurens påverkan. Stimuli applikation kommer inte att upprepas mer än vad som krävs för att få noggranna och reproducerbara mätningar. Djuren inom reumatoid artritns modellen kontrolleras regelbundet och avslutas om avbrytningspunkten är nådd. För bedömning av djurens situation och för att undvika lidande och stress kommer Karolinska Institutets utökade bedömningsmall att användas. Vid osäkra fall kommer veterinär att kontaktas. Extra tillsyn och extra berikning kommer att ges vid de tillfällen som kräver detta.

Bilaga 1, sida 1



Bilaga 1, sida 2

	Försöksgrupp 2 Centrala mekanismer (CM) i norm.känslighet		Försöksgrupp 3 Centrala mekanismer (CM) i kronisk smärta
	Variant I	Variant II	
Max sensoriska test/ Max avsevärda test/ Max test dagar	45/5/10	22/3/6	60/12/25- RA utan CM 45/12/22- SNI utan CM 30/5/13-RA/SNI med CM
Max "centrala mechanism" åtgärder	1	2, dvs "Den andra CM åtgärd" utförs	1
Kronisk smärta modell	-	-	1, nervskada eller RA
Max djur	2300	150	1000

1. Finns en utvärdering av 47/13? Vänligen bifoga i så fall.
Svar: Nej, det finns inte. Vi har inlämnat utvärdering för ett antal andra tillstånd som gått ut under de senaste två åren men har inte fått förfrågan kring 47/13.
2. Fanns det några villkor för det etiska godkännandet för 47/13?
Svar: Det fanns 14 villkor, ett av dem var senare ändrad genom ett tillägg (lång bedövning för nervskada modell).
Följdfråga: Vad var villkoren, och är det några av dessa villkor som specifikt hindrat er från att uppnå syftet med er forskning?

Villkor till N 47/13 med kommenterar i samband med nuvarande ansökan:

1. Godkännandet gäller endast för i ansökan angivna stammar. – *Som vi förstår denna regler har ändrats.*
2. Godkännandet gäller endast för klart angivna försöksupplägg enligt kompletteringar till ansökan – *blir standard.*
3. Genotypning ska ske i första hand genom öronklipp, eller om nödvändigt genom svansklipp under anestesi om det görs efter avvänjning - *blir standard.*
4. Beträffande djur med fenotyp ska försöket avbrytas vid 0,3 enligt KI :s mall. – *I vår "huvud" tillstånd 9702-2018 (som fortfarande aktuellt) har vi 0.4 avbrytnings för denna situation och skulle vilja behålla det.*
5. Vid upprepade i.p.-injektioner ska djurets buk palperas och försöket avbrytas vid Peritonit - *blir standard.*
6. Försöket ska avbrytas vid klåda som ger upphov till sår, eller klåda som påtagligt stör djuren under flera dagar.- *gäller*
7. Försöket ska avbrytas vid en viktminskning på 20% eller mer. Vikt ska jämföras med obehandlade kontroldjur. – *Det är inte relevant. Djur minskar inte vikt i denna modell.*
8. CFA får ges endast en gång per djur. – *vi slutade att använda CFA. Karragenan används istället.*
9. Max 3 upprepningar av känslighetstest och max en kombination av två olika känslighetstester med en duration på som mest 10 min/test. – *detta stämmer inte nu och vi jobbar inte under sådana villkor från 2018 (tillstånd 9702-2018).*
10. Max 3 upprepningar av sensorisk stimultest och max en kombination av två olika stimultester med en duration på som mest 10 min/test. – *detta stämmer inte nu och vi jobbar inte under sådana villkor från 2018 (tillstånd 9702-2018)*
- 11 . Vid intradermal injektion ska minsta möjliga volym ges och minsta möjliga nål användas. - *blir standard.*
12. Post-operativ smärtlindring, utom vid minipumpsoperation, ska ges i minst 72 timmar och därefter vid behov. Nämnden rekommenderar en kombination av NSAID och buprenorfin/Temgesic. – *kan inte används*
- 13 . Miljöberikning ska ges enligt KI:s miljöberikningsplan. - *blir standard.*
- 14 . Försöket är av avsevärd svårhetsgrad.

3. Kommer avels- och kolonidjur avlivas efter 18 mån eller 6 kullar? Om längre tid är nödvändigt vänligen motivera varför djuren måste hållas så länge.

Svar: Det går bra med 18 mån eller 6 kullar.

4. På sid 7 står följande: "Tid räknas från först måttlig/avsevärd åtgärd, d.v.s. metoder som t.ex. s.c., i.p., p.o. eller milda sensorisk testning sätter inga specifika slutpunkter utan då använder vi slutpunkter för koloni och avelsdjur." Hur tänker ni kring detta då upprepning av t.ex. i.p är av måttlig svårhetsgrad, vilket de andra administreringarna/sensoriska testerna också kan vara om de upprepas ofta. Vänligen ändra och ange tydligare slutpunkter även för dessa försök.

Svar: Om djuren når måttligt eller avsevärd svårighetsgrad är slutpunkt 6 resp 4 månader från dagen svårighet når respektive grad, fast inte för djur i RA modell. I denna modell är slutpunkt 8 månader från LPS-injektion.

Följdfråga 4a: Slutpunkten är den tidpunkt där försöksledaren utgår från att ha uppnått syftet med försöket. För "generiska åtgärder" där slutpunkten kan bli upp till 24 månader (en normal livslängd för en mus på försöksdjursanläggning) innebär detta att ni inte kan säkerställa när under en livstid som syftet med dessa generiska åtgärder har uppnåtts. Det gör det tveksamt vad syftet är. Kan ni utveckla ert resonemang?

Svar: T.ex, för att ha effekt för specifik cell grupp måste djur injiceras med TAM senast när de är 2-3 veckor gamla. Då kan det ta 2-6 månader innan vi börja att använda dem för någon avsevärd åtgärd, t.ex nervsakada eller RA modell som bestämmer ny slutpunkt separat. Vi menar att "generiska åtgärder" används oftast i samband med följande "stora åtgärder" som måste bestämma slutpunkt i första hand. Vi tror att vi kan klara med 14 månader slutpunkt för "generiska åtgärder".

5. Ni anger på s. 12 att ni vill använda djur som riskerar bli blinda på ett eller båda ögonen. Vi föreslår att endast djur som är blinda på ett öga får användas. Kommer ni följa det och begär ni i så fall några fler djur?

Svar: blinda på ett öga, enl ovan är OK.

6. Tåspetsbiopsi ska undvikas om möjligt enligt L150 14 Kap. 8-9§§. Kommer ni enbart använda tåspetsbiopsi (max en tå per djur P4-P7) om musungar ska användas i försök före P7 och inga alternativ är möjliga och att djuren får smärtlindring innan biopsi tas?

Svar: Ja. Vi kommer enbart använda tåspetsbiopsi (max en tå per djur P4-P7) om musungar ska användas i försök före P10 (för att hinna analysera biopsi som tagna P7) och inga alternativ är möjliga och att djuren får smärtlindring innan biopsi tas.

7. 0,5mm tåspetsbiopsi, riskerar det vara mer än yttersta falangen på en tå? Om ja, motivera varför det är absolut nödvändigt att ta mer än yttersta falangen på en tå.

Svar: Vi tar så lite som möjligt men tillräckligt för att kunna göra reproducerbar genotypning. Som vi fattar räcker yttersta falangen för detta.

8. Kommer ni tillämpa bedömningsmall 1B och avbrytningspunkter för mus innan avvänjning? Med undantag för enbart okulär bedömning de första dagarna efter födsel?

Svar: Ja

9. 9 timmar med smärtstimulerande tester låter väldigt påfrestande för djuren. Kan antalet stimuleringstester på en dag minskas?

Svar: Det är fel tolkat. Vi vill uppmärksamma nämnden att djur riskerar att uppleva smärta enbart i de försök med måttlig och avsevärda tester. Vi har klassat måttlig svårighetsgrad som den grad som uppstår i alla försök där stimulus appliceringen upphör så snart stimulus når nivå som orsakar obehag, vilket leder till en reaktion hos djuren. Det betyder att "smärtstimulering" som kan fortgå längre än några sekunder bara är aktuell för avsevärda test. Den andra moment inom 9 timmar kommer från experimentella schema när några djur sitter på arena ganska lång tid för habituering och genom att test utförs i turordning till olika djur, dvs varje djur utsätts inte för stimuli mer än 5% av total experimentala tiden. Den större delen av de 9 timmarna sover (eller nästan sover) djuren på arenan.

Följdfråga 9b: Är det möjligt att djuret har någon typ av påverkan (genetiskt eller annan) att de inte klarar av att dra undan tasserna i tid och får skador på tasserna vid vissa av de sensoriska testerna?

Svar: För att undvika denna situation har vi i alla våra tester beskrivit slutpunkt. Vi har nu gått igenom alla testbeskrivningar igen och kan addera följande begränsningar:

* pinprick- maximalt 6 applikationer (3 per tass) i de fall djuren inte svarar på stimuli.

* hot plate – avbrytningstiden är halva tiden som är listad för detta försök ifall djuret inte uppvisar någon reaktion. Tex, avbrytningstid vid 48°C – är 1 min ifall djuret inte reagerar på stimuli. Denna begränsning är inte relevant för kyla eftersom den kyla vi applicerar inte är så låg utan motsvarar vad dom upplever då dom tex springer på snö vilket inte leder till någon skada.

10. Totalt 45 smärtstimulerande tester låter mycket för ett enskilt djur, liksom upp till 6 tester på en dag. Kan antalet minskas?

Svar: Som beskrivs ovan, i svar 9, djur upplever inte smärta i samband med ringa och milda test (8 test av 17). Under måttliga test (7 av 17 test) kan djur uppleva smärta som mest under bara några sekunder. Det är bara under 2 avsevärda (2 av 17) test som djur kan uppleva smärta längre. 6 test per djur/dag utförs extremt sällan, max under två dagar per djur och på mindre än i 5% av djuren. Under de senaste åren har vi optimerat protokollet och som har lett till ovan minskning och vi kan inte minska det ytterligare. Dock vill vi att nämnden observerar att dessa är maximalt antal test. För de flesta djur blir det mindre, 3 eller 4 test per dag under mindre än 10 dagar.

11. Hur länge kan djuren som längst vara utan mat och/eller vatten under en testdag?

Svar: 6 timmar, men i de flesta fall är det kortare. 1) Vi föreslår i ansökan att vid kronisk fysisk aktivitet att djuren har en paus med tillgång till vatten och mat var 4 timme. 4 timmars begränsning fungerar inte här (sensorisk testning) eftersom habitueringen kan ta upp till 2 timmar (tex, på nätgolvet) och sedan utförs flera tester på den arenan. Detta kan sammantaget ta upp till 6 h. Om vi under denna tid skulle sätta djuren tillbaka i buren för en paus med mat och vatten så måste djuren habitueras igen till arenan. 6 timmar gäller således den maximala tiden i samma arena. Vi vill här påminna om att sensoriska testerna utförs dagtid, då djuren normalt sover större delen av tiden och vatten och matintaget är minimalt. 6 timmars med begränsning av mat under denna tid har liten eller obefintlig påverkan på djuren.

12. Hur länge riskerar djuren känna smärta efter kemisk känslighetstest? Kommer djuren få smärtlindring efter 90 min vid kemiska känslighetstest (dvs efter 90 min samling av data avslutats)?

Svar: Kemiska substanser skiljer sig åt. Capsaicin och formalin har en effekt upp till ca 30 min resp 90 min emedan carrageenan (klassisk inflammatorisk modell) har en effekt upp till 48 timmar eller längre. Ja, djuren får smärtlindring efter att data har inhämtats i de fall kvarvarande spontan smärtbeteende observeras efter att datainhämtningen är klar. Datainsamling för carrageenan utförs under upp till 58 timmar efter administrering av substans, så smärtlindring ges inte innan denna tidpunkt. Om smärtlindring ges i samband med sensorisk testning, så räknas inte injektionen av smärtlindring in i det totala tillåtna antalet injektioner, eller så ökar det totala tillåtna antalet tillåtna injektioner med samma antal som antalet administrerade smärtlindringar i samband med kemisk känslighetstest.

Följdfråga 12b: Vänligen motivera varför de sensoriska testerna med avsevärd svårhetsgrad krävs för att uppnå syftet med försöket.

I alla våra studier behöver vi utföra olika test för att förstå hur känsligheten förändras. Kemisk känslighet är en viktig typ av sensorisk och kan bara testas genom kemiska känslighetstest. I motsats till de andra testen klassar vi dem som avsevärda. Det mest svåra testet, carrageenan är den enda modellen vi använder för inflammatorisk smärta. Vi mäter i detta test känsligheten under den inflammatoriska processen. Detta tar upp till tre dagar och analys av mekanismer kring inflammatorisk smärta kan inte utföras utan detta eller liknande test. Inflammatorisk smärta är en kliniskt mycket viktig typ av smärta.

Avsevärd variant av Hot/Cold plate: när djur utsätts för obehaglig temperatur uttrycker de två typer av beteenden, som förmedlas av två olika neuronala vägar. Den ena typen av beteende (t.ex tass lyftning) är en reflex vilket kommer först under obehaglig stimulering och antas förmedlas av ryggmärgsnervbanor (dvs lokala reflexvägar i ryggmärgen). Den andra typen av beteende (t.ex. tass "bevakning" och slickning) kommer senare, och kallas för

”coping” dvs omhändertagande beteende och involverar andra populationer av celler i ryggmärgen och också specifika nervcellspopulationer i hjärnan. De två olika typer av beteende visar därför inblandning av olika (nerv) cells populationer och signalbanor och det är viktigt att de övervakas tillsammans, även om ”coping” – beteendet uppträder med en viss fördröjning, vilket innebär att djur måste stanna längre kvar på plattan. Detta är standard för att registrera ”coping” beteende och det finns ingen annan metod för att urskilja detta beteende eftersom det visar sig med en viss tidsförskjutning (dvs efter ”reflex” beteende) under exponering till obehaglig temperatur.

Följdfråga 12c: Närvarar veterinär vid de avsevärda sensoriska testerna?

Ja, vi alltid informera vet om kommande avsevärda procedur och oftast vet är på plats åtminstone under första par gånger.

Följdfråga12d: Är det möjligt att korta ned tiden för datainsamling vid test med karrageenan så att djuren kan få smärtlindring tidigare?

Nej, vi diskuterade denna fråga i labbet innan vi svarade fr.12. Vi skulle vilja behålla maximal 58 timmar efter injektion. Ofta används 72 h och vi har redan minskat det med 14 h.

13. Om djuren har fortsatt klåda efter att testtillfälle avslutats, avlivas djuren då?

Svar:

Om djuren har kontinuerlig klåda 90 min efter test sessionen avslutats injiceras smärtlindrande eller appliceras Xylocain kräm maximalt två gånger och ifall klåda fortsätter efter detta avlivas djuret.

14. Hot/cold plate test. Det räcker med att ett djur är påverkat 20 min efter avslutat test för att klassificera det som avsevärt. All svårhetsbedömning ska utgå från den högsta påverkan ett enskilt djur kan uppnå. Ok?

Svar: Ja, individuell svårighetsgrad avgörs av det högsta som ett enskilt djur påverkas av under hela experimentella flödet. Dock vill vi påpeka följande: På sida 24 i ansökan beskriver vi i detalj hur svårighetsgrad bestäms för varje djur för de olika varianterna av hot/cold plate test, där vissa är avsevärda och andra måttliga. Där framgår att avsevärd klassas som sådan då det finns ett kvarvarande, icke-provocerat påverkan på beteende 20 min efter att djuret är tillbaka i omgivande temperatur och svårighetsgrad är måttlig då något kvarvarande beteende inte finns hos åtminstone 80% djuret. Vi kommer inte att utföra testerna som bestämmer svårighetsgrad på alla djur i experiment utan det görs först på ett mindre antal och alla djur därefter kommer att klassas som måttlig eller avsevärd baserat på de resultaten.

Följdfråga 14b: Om ett djur i försök riskerar vara påverkat 20 min efter avslutat test ska nämnden klassificera testet som avsevärt. Det medför rimligtvis att det räcker med att ett djur i experimenten för klassificering av testet är påverkat 20 min efter avslutat test för att klassificera det som avsevärt. Kan ni följa det då det underlättar om ni och nämnden har samma klassificering?

Svar: Det går bra. Om åtminstone ett djur från 8 testad visar oprovocerade beteende 20 min efter sensorisk testning slutar då klassificeras test som avsevärd. Annars klassificeras test som måttligt.

15. Kommer de djur som har/riskerar fortsatt påverkan efter avslutat hot/cold plate test få smärtlindring?

Svar: Ja, i de fall minst 2 av 6 djur uppvisar oprovocerat beteende (lyfter eller skakar tasserna) 20 min efter djuret tagits bort från hot/cold plate, så klassas testet som avsevärt och alla djur som genomgår samma variant av test i samma experimentella flöde får smärtlindring en gång efter att testet avslutats. Dock vill vi påpeka att vi inte tror att detta kommer att behövas.

16. Är det verkligen nödvändigt med ett avsevärt och två måttliga test på en och samma testdag? Kan ni inte begränsa till att om avsevärt test genomförs ska inte djuren genomgå något annat den testdagen och om måttligt test genomförs så får det bara kombineras med ett mildt eller max ett ytterligare måttligt test samma dag?

Svar: Svar: Det är relevant om cold/hot plate test varianterna som tillåter mätning av så kallat nociceptivt beteende (av måttlig/avsevärd karaktär) är klassat som avsevärt (se p. 24 kriterier, se svar 15 ovan) eller måttlig (som är det avsedda testet). Om testet är måttligt, så är det enda avsevärda testet vi behöver utföra kemisk känslighetstest och då kommer max antal avsevärda test per djur bli 3 (inte 12). Avsevärda test utförs endast som det sista testet under dagen. Generellt sett utförs testen i block under samma dag eftersom känsligheten förändras över tid och det är viktigt att ha mätningar av olika typer av känslighet under samma dag för att kunna jämföra resultaten. Det är således vetenskapligt viktigt att kunna göra olika mätningar under samma dag.

Följdfråga 16b: Finns det inte en stor risk att resultaten påverkas av att djuren utsatts för smärtstimuli samma dag så att de reagerar mer?

Svar: nej, det tror vi inte. För att undvika sådan risk beskriver vi på s 25 av ansökan vilka test kan inte kombineras på samma djur/dag: "1) PAM; Randall-Selitto; Kläm test 2) Icke smärtsamt aceton test; Kylsmärttest; Tröskeln för termiskt obehag (för kyla); 3) Radiantheat; Tröskeln för termiskt obehag (värme); Hot plate." Andra test skulle inte påverka varandra. Kemisk känslighet test alltid utförs sist i på samma dag om kombineras med andra test.

17. Max 12 avsevärda test/djur. Kan detta minskas?

Svar: Se svar 16. Vi hoppas att nocifensiva testet (lång varianten) av cold/hot plate kommer att klassas som måttligt. Vi kommer i detta fall behöva max 3 avsevärda test (kemiska test). Om mot förmodan detta test visar sig som avsevärd kan vi inte begränsa oss till färre än 10 avsevärda test eftersom nocifensiva svaret är viktigt att

kunna mäta för att förstå den normala känsligheten och det behöver upprepas för att förstå dynamiken/förändringar av känsligheten.

Följdfråga 17b: Kommer max 10 avsevärda test per djur genomföras?

Svar: OK, max 10 avsevärda test.

18. Åtgärd 5 och 6, kirurgiska ingrepp. 2-3 cm stora snitt är ganska mycket på mus och de bör väl få smärtlindring minst två dygn post-op och därefter vid behov?

Svar: Vi anser att muskel och benborttagning påverkar djuren mer än snittets storlek och detta påverkas inte nödvändigtvis av snittets längd. I samband med discussion med nämnden för vår nyligen godkända 2903-2020 har vi reviderat våra lab rutiner för att utföra extra vård och smärtlindring vid denna typ av kirurgi. Det framfördes att läkning av ett kirurgiskt hudsnitt går mycket fort. Normalt är stygnen intakta under 3 dagar och faller bort vid 7 dagar efter kirurgin och huden är då läkt. Efter diskussion med forskare med många års erfarenhet av sådan kirurgi skall minimal anaestesi för kirurgin vara: i.t (med hud snitt) and l.sp (lumbar) – en systemisk anaestesi åtminstone nästa dag efter ingrepp. Vi påpekar också att i.t. normal ges utan incision i huden. Sålunda tolererar djuren väl i.t./i.sp vid ansökt kirurgi och vi hoppas att nämnden tillgodogör sig vår expertis i denna fråga. Vid behov ges förstås ytterligare anaestesi.

Följdfråga 18b: Notera att vi efterfrågar post-op behandling med analgetika (smärtlindrande), inte förlängd anestesi. Ni har angett att ni ger karprofen om ett djur uttrycker tecken på smärta. Vi rekommenderar att ni ger post-op smärtlindring i 2 dygn efter kirurgi oavsett tecken. Kommer ni ge post-operativ smärtlindring i 2 dygn efter kirurgi?

Answer: OK.

19. Resuturering får ske högst en gång. Ok?

Svar: OK.

20. Kommer ni tillämpa bilaga 2 till bedömningsmallen, Ansiktsuttryck kopplade till smärta före, under och efter testtillfällena, och med undantag för post-op då smärtlindring ges, avbryta försök/avliva djur vid tecken på avsevärd smärta eller måttlig smärta under längre tid (mer än tre dagar)?

Svar: OK

21. Många människor mår illa av opiater, finns det risk för detta även hos möss? Hur säkerställer ni validiteten i försöken i så fall? Finns det alternativ till denna metod som är mildare för djuren?

Svar: Det är inte förväntat att djuren mår illa av opiater. Djur som uppenbarligen är sjuka under opioidexponeringen avlivs. Den enda alternativa metoden för att inducera opioidberoende är att inplantera en subdermal morfin "pellet". Dock rekapitulerar inte denna modell människans opioidberoende eftersom exponeringen är stadig och kontinuerlig. I människa konsumeras opioider intermittent, med timmar mellan intaget och med ökade mängder då tolerans byggs upp. Detsamma gäller djur, administrering i musmodellen på det föreslagna sättet leder till större tolerans och snabbare utveckling vilket visar att musmodellen rekapitulerar situationen hos opioidberoendet hos människor.

22. Vi föreslår att ni särskilt överväger och undersöker alternativa modeller/upplägg för stress, fysisk aktivitet och sömnbrist. Och väljer mindre plågsamma och mer relevanta modeller som mer liknar den stress, depressions- och sömnbristnivå människor med smärta har. De åtgärder ni föreslår är samtliga av avsevärd svårhetsgrad och tillsammans med övriga åtgärder av avsevärd svårhetsgrad, där flera dessutom kommer upprepas och kombineras, medför en allt för stor påfrestning på djuren och strider mot Djurskyddsförordningen 7 Kap. 9§. Se nedan några skäl för detta:

- a) Max antal Porsolt/FST/djur som centrala nämnden godkänt är 4 st och de är på max 15 min vardera. 21 st FST upp till 30 min är alldeles för mycket. Kontinuerlig immobilisering kommer djuren att anpassa sig till och därmed nå lägre stress efter hand. Titta gärna på möjliga upplägg/paradigm med varierande stressorer istället för att uppnå mild/måttlig depression/stress. Sådana upplägg/paradigm förekommer bl.a. inom depressionsforskning.

Svar: Svar: Vi har tittat på kronisk varierande stress paradigm men detta har inte använts för smärtstudier. I motsats så har effekten av kronisk och akut immobilisering på smärta studerats omfattande. Dock har vi efter detta förslag av nämnden beslutat att testa variabel stress och beskriver detta paradigm som ett förslag till fråga 34.

- b) 12 timmar på löpband utan mat OCH vatten medför en väldigt stor påverkan på möss på flertalet variabler som utöver djurens lidande även riskerar påverka era möjligheter att tolka resultaten. 5 min paus för att äta är för kort tid och djuren hinner inte tillgodogöra sig näring till musklerna, dessutom ska djuren få elchocker och vara i rörelse vilket ytterligare försvårar ämnesomsättningen. Med mössens snabba ämnesomsättning motsvarar nog en så lång tid med forcerad aktivitet och utan mat flera dygn för en människa. Vilka andra alternativa åtgärder kan användas för att uppnå sömnbrist/depression? Är det t.ex. möjligt att istället ändra på dygncykel och belysningstider, blinkande ljus etc.?

Svar: Ja, vi instämmer att 12 h utan vatten påverkar djuren, men vi har inte föreslagit längre tid än 4 h. Vi har också försökt hitta information som visar att 5 minuter är för kort paustid för att äta och dricka men hittar inte någon dokumentation som visar att det är för kort. Om nämnden har fakta och är säker på detta, så kan vi öka pausen till 10 min mat/vatten paus

var 4e h. Vi hoppas också att vi kommer att kunna minska spring protokollets längd från 12 till 10 timmar per dag. Andra rapporterade och etablerade metoder för sömndeprivering inkluderar: Blomvasmetoden (möss placeras i en behållare fylld med ca 1 cm vatten, och en liten plattform för att hålla sig torr). Plattformen är så liten att musen kan undvika vattnen men att den inte kan ligga ner; Nya objektmodellen där ett nytt objekt eller en knackning på buren presenteras varje gång musen håller på att somnas. Den första modellen förhindrar att musen ligger under experimentet och därmed har en större stress-effekt än treadmill (där musen kan ligga ner då och då under kortare perioder av ca 5 sekunder per gång). Den andra metoden involverar EEG och EMG apparater för att kunna mäta vakenhet (baserat på hjärn eller muskelaktivitet), vilket skulle involvera invasiv kirurgi. Av dessa orsaker verkar treadmill vara den minst stressande metoden för möss. Vad gäller elektiska stöten så vill vi nämna att musen lär sig fort och att det är sannolikt att antalet stötar inte blir fler än 4 st under en tid av flera timmar. Sålunda kommer stötarna inte bidra till minskad möjlighet för intag av vatten och mat. Men som nämns ovan kan vi öka pauserna till 10 min.

Studien av E G Marchant , R E Mistlberger. *Physiol Behav.* 1996 Aug;60(2):657-63 indikerar att treadmill paradigm inte orsakar påtaglig stress. Dom använde sig av löpning i springband under 3hr varje dag (10 min mat/vatten paus), 6 dagar/vecka under 7 veckor. I dessa försök använde dom sig av en hastighet som är 5x snabbare än den vi ansöker om (16m/min vs. 3m/min), och total distans var 2.88km (vs. 2.16km i vårt 12hr protokoll). Författarna rapporterar ingen stress-relaterad fenotyp i detta protokoll.

Följdfråga 22 b2: Är det möjligt att öka viloperioden till 10 minuter och att ni erbjuder näringsgel på burgolvet under vilopauserna?

Vi vill starta vårt svar till fråga 22 med att påminna om det som finns skrivet på sidan 33 i ansökan: "Detta test är designat för att simulera utdragen lågintensitet träning och leder inte till djurens utmattning. Springhjulets hastighet är låg, bara 5cm/s (< 0.2 km/h), vilket är ca 6% av musens snitthastighet då den springer frivilligt. Den totala distansen (2,16 km) är bara drygt 20% av den som möss springer i fångenskap per natt. Både hastighet och längd som musen springer är således helt inom dess normala fysiska aktivitet." Sålunda vill vi klargöra att både hastighet och avstånd är väldigt låg, till och med för en mus. Det är inte utmattande, inte ens intensivt, det motsvarar en promenad.

Vi skulle uppskatta om den första pausen begränsas till 5 minuter. Om djuret inte äter och/eller dricker under denna första paus ökar vi nästa paus till 10 minuter för att försäkra oss om tillgång till vatten och mat. Under en paus (särskild 10 min) kan vi behöva försäkra oss om att djuren inte somnar genom att tex knacka på buren eller peta på djuret. Vi hoppas också att nämnden samtycker att vi kan begränsa en paus till 5 min om den följer efter ett träningsavsnitt på 3 h eller kortare. Vi kan göra näringsgel tillgängligt på burbotten såsom ni rekommenderar även om vi inte tror att det behövs med tanke på att träningen inte är intensiv.

Följdfråga 22 b3: 10 timmar pågående aktivitet för mus med snabb ämnesomsättning motsvarar en mycket längre tid för människa. Om syftet är att undersöka lågintensitetsträningens påverkan på smärta borde väl en kortare tid av aktivitet vara mer relevant? En människa tränar väl sällan mer än någon timme per tillfälle?

Denna tid krävs för sömndeprivationsstudien och vi behöver därför också använda denna tid för kontrollförsök under vakna timmar. Vi skulle kunna (och kommer troligen) använda en kortare tid för experimenten där vi studerar låg intensitetsträning. Vad gäller relation till träning hos människa så motsvarar detta promenad/vandring vilket utförs av många under flera timmar till en hel dag.

Följdfråga 22 b4: Har ni undersökt hur lång tid det tar för en mus att bilda glykogen efter matintag som kan användas vid fortsatt aktivitet på motionshjul/löpband? Musen kanske också behöver några minuter innan matintag och vätska kan intas samt vila/återhämtning innan de kan börja springa igen direkt efter intag? Vänligen se över om protokollet för både pågående fysisk aktivitet samt sömnbrist kan justeras ytterligare.

I likhet med uthålligheten hos vältränade atleter så har musen en reducerad tillgång till muskelglykogen som ju snabbt tar slut och inte återskapas under träningen. Musens glykogen som används vid arbete lagras i huvudsak i levern och detta glykogenet kan förnyas också under arbete ifall kolhydrater finns tillgängligt. Med de 5-10 minuter paus för födo- och vattenintag varje 4 timmar ska det finnas tillräckligt med tid för att säkerställa att glykogendepåerna förnyas för fortsatt arbete. Var vänlig och notera att detta gäller lågintensitetsarbete som motsvarar att ta en promenad.

- c) Nämnden brukar inte godkänna elstötar med mer än max 0,5 mA för mus! Och max 3 stötar per testtillfälle. Om absolut nödvändigt kan strömstyrkan få höjas till 0,7mA för mer resistenta stammar. Vänligen undersök andra försöksupplägg/åtgärder som inte omfattar elstötar och/eller löpband/motionshjul.

Svar: Vi skulle mycket gärna vilja följa denna begränsning vad gäller max anta ock ström, men vi skulle isåfall kunna hamna i en situation där det inte är tillräckligt för att hålla djuren på springbandet och då omintetgörs hela experimentet. Denna oro bekräftas av en postdoc i labbet som har utfört denna typ av försök i sitt tidigare laboratorium. Han menar att så låg ström och begränsade antal stötar, speciellt under de första inlärnings sessionerna, gör att mössen väljer att inte gå tillbaks till springbandet. Vi undrar vilken typ av försök som nämnden har beviljat max 0.5 mA and 3 electriska stötar? Intuitivt så används dessa antal stötar i försök som är maximalt 30 min, 10 timmar långt försök kräver fler stötar, således bör antalet stötar anpassas till längden av experimentet till viss grad. Vi föreslår att vi börjar med att använda max antal stötar som 6 och max ström 0.7 mA för den första sessionen och max 3 stötar (samma ström) under följande sessioner.

Om det inte fungerar i fler än 20% av djuren (dvs djur återvänder inte till treadmill) kan båda parametrarna ökas (max elstöt 8 för första sessionen och 5 efterföljande sessioner, max 1 mA, efter en diskussion med veterinär och/eller DO). Var god att också se motivation för strömstyrka och antal som behövs under p. 32-33.

Följdfråga 22 c2: Kan ni börja med ännu lägre elstötar (0,2 mA) för både pågående fysisk aktivitet och sömnbrist och se om det fungerar och endast höja till 0,5mA om nödvändigt? 0,7mA får endast användas om ni ska använda någon stam som av någon anledning är mer resistent och endast i första sessionen samt max 3 stötar. Strömstyrka på 1mA eller mer ska ej användas på mus. Kommer ni följa det?

Vi kan börja med 0.2mA, men vi tror inte detta kommer att fungera såsom vi påtalade tidigare. För att öka möjligheterna till att sådan låg spänning fungerar kan vi behöva öka max antal stötar till 6 i alla sessioner, eftersom mössen då inte lär sig lika snabbt, sålunda $6 \cdot 7 = 42$ maximal stötar per mouse (bara för 0.2 mA).

Om ovan protokoll inte fungerar (vilket vi dessvärre tror) behöver vi öka till 0.5mA, med 6 stötar maximalt under den första sessionen och 3 för följande försök med ett maxtotalantal av 20.

Om detta inte fungerar ökar vi till 0.7mA och använder en begränsning av max 3 stötar för alla sessionen (inkl första), såsom föreslaget av kommitteen. Om detta inte fungerar kommer vi att behöva 6 stötar under första sessionen och 3 följande med max total antal 20.

Maximal ström som vi vill ha möjlighet att använda är 0.8 mA med antal maximala stötar (5/3/20). Vi hoppas att detta inte ska vara nödvändigt och använder det endast om de lägre spänningarna (0.5 and 0.7 mA) inte fungerar.

Försöksprotokollet att gradvis öka spänningen tillåter oss att bestämma minimalt antal stötar och gör att vi inte utsätter djuren för onödigt lidande eller orsakar att försöket misslyckas.

Följdfråga 22 c3: Kan ni använda max 6 stötar den första dagen och därefter max 3 stötar per session samt totalt max 20 stötar för samtliga sessioner (både försök med pågående fysisk aktivitet och sömnbrist)?

Svar: Vi tror att vi kan utföra försöken med dessa begränsningar om vi tillåts att använda 0.5 mA and eventuellt 0.7 mA (om 0.5 mA inte är tillräckligt). Dock kommer denna begränsning troligen inte att fungera om vi inte kan gå över 0.5 mA för vissa av musstammarna.

.

23. Hur kommer åtgärderna 6-9 och 10 i försöksgrupp: centrala mekanismer i normal känslighet kombineras med andra tester/övriga delar av ansökan?

Svar: Var snäll och se bilaga 1, båda sidor. Djur som används i denna grupp används inte i nästa försöksgrupp, "centrala mekanismer i kronisk smärta". I denna grupp ska vi studera hur olika central mekanism (CM) upplevelser (som åtgärder 6-9) påverkar normal känslighet. Vanliga kombinationer av planerade experiment kan beskrivas som följande:

- I. Djur testas för sensoriska tester t.ex. 2-3 dagar (baslinje etablering). Då utsätts djur till CM upplevelser (en av åtgärder 6-9). Senare testas djur igen några dagar (sensoriska test) för att se effekt på normal känslighet.
- II. Samma som ovan men åtgärd 6-9 kombineras med injektion av tamoxifen (eller anda ämne som aktiverar specifik gen uttryck eller funktion t.ex DNA rekombinase). Denna variant markerar specifik cellgrupp som manipuleras (aktiveras alt bromsas) under senare sensoriska test med injektion av CNO eller andra specifika ämnen.
- III. Djur testas för sensoriska tester 2-3 dagar (baseline etablering). Kombination av två samma eller olika CM åtgärder (dvs 6-9 plus 10). Den första CM åtgärden (6-9) kombineras med tamoxifen (TAM, eller andra ämne med

samma syftet). Den andra CM åtgärd (10) kan utföras utan TAM (då terminernas djur några timmar senare) eller med TAM (eller liknande), då utsätts djur senare till få sensoriska test.

24. Hur kommer åtgärderna 7-12 i försöksgrupp: centrala mekanismer i kronisk smärta kombineras med andra tester/övriga delar av ansökan?

Svar: Var snäll och se bilaga 1, båda sidor. Djur som används i denna grupp används inte i försöksgrupp, "centrala mekanismer i normal känslighet". I denna grupp ska vi studera hur celler som involveras/aktiveras av olika central mekanism (CM) upplevelser (som åtgärder 7-10) påverkar utveckling av kronisk smärta modeller. Vi planerar att utföra följande experimentellt flöde i denna försöksgrupp

I. Djur testas för sensoriska tester t.ex. 2-3 dagar (baslinje etablering). Då utsätts djur till CM upplevelser (en av åtgärder 7-10) och detta kombineras med t.ex. TAM injektion (för att markera specifika celler). Senare utsätt djur till en av två smärta modell (åtgärd 11 alt 12). Senare utsätts djur till sensoriska test. Både smärta modell utveckling samt sensoriska testning kan kombineras med injektion av t.ex CNO för att aktivering/inhibering av cellpopulation som markeras under åtgärder 7-10.

Således, CM åtgärd i denna grupp utförs max en gång och alltid innan smärtmodell. Sensorisk test kan utföras innan CM åtgärd (7-10), mellan CM (7-10) och smärt modell åtgärd (11-12) eller efter smärt modell.

25. Åtgärd 12 nervskada. Är det möjligt att ge djuren systemisk smärtlindring innan operation/skada samt post-op, så att djuren är smärtlindrade minst 48 timmar efter op?

Svar: Nej, det är tyvärr inte möjligt. För att nervskade modell ska utvecklas behövs nervaktivitet. Systemisk smärtlindring innan operation är det som kan användas maximalt.

Följdfråga 25b: Kommer djuren få systemisk smärtlindring pre-operativt så att de är smärtlindrade den mest akuta fasen vid uppvaknande, minst 12 timmar (längre om möjligt)?

Svar. Ja djur får det pre-operativt.

26. Förväntas samtliga djur efter nervskada få hälta? Annars bör väl avbrytningspunkten vara sammanlagt vid 0,4? Ni har ju begärt undantag för att avliva vid 0,4 på enskild parameter vid hälta. Motivera annars varför högre sammanlagd avbrytning krävs.

Svar: Det stämmer att djur efter nervskada har vanligtvis inte hälsa. Men vi kan inte utesluta att djur efter centrala mekanismer åtgärd kan reagera starkare på nervskada. Så, vi skulle vilja behålla ökat avbrytningspunkt för djur som utsätts för både central mekanism åtgärd och nervskada.

Följdfråga 26b: Om djuren skulle reagera starkare efter nervskada, på vilket sätt kan det yttra sig då? Vilken poäng förväntas i så fall och hur länge?

Svar: Svår att veta i förhand, men mest logisk att det blir hälsa för maximal två veckor. Kraftig hälsa ger 0.4 i parameter "Rörelse och kroppshållning". Dvs avbrytningspunkt förhöjning under två veckor efter nervskada (om kombineras med "central mekanism" åtgärd) är: total poäng 0.8 p om 0.4 kommer från hälsa. Djuren också avlivas om de når 0,4 på en enskild parameter med undantag av kroppsrörelse störning (hälsa).

27. Är det möjligt att välja en artritmodell som ger lägre artritsscore, alternativt avbryta vid lägre total artritsscore? Förslagsvis avbryta vid 0,8 sammanlagt eller 0,4 på enskild parameter, direkt vid mer än 35 poäng eller vid 30-34 poäng efter 10 dagar? Motivera annars varför högre lidande är absolut nödvändigt.

Svar: Antikropps-inducerade artriten som vi använder är mindre svår än den vanligtvis använda artrit modellen med kollagen-inducerad artrit (CIA). I vår modell är den kliniska påverkan (inflammation) lägre och kortare. Vi kan sätta slutpunkt till 0.8 total poäng eller 0.4 som individuell parameter. Dock behöver vi såsom vi beskriver i ansökan ett undantag: avbrytningspunkt behöver vara 1.2 48 h efter LPS injektion (LPS injektion kan leda till feber liknande symptom men återhämtar sig inom 48 timmar). Om mössen får artrit poäng mer än 35 (maximum 60), så kan djuren avlivas såsom föreslaget. Försöket avbryts också om djuren har mer än 30 under 14 dagar.

28. Om sammanlagd avbrytningspunkt är 0,8 (ej enbart artritförsök) hur länge kan djuren ha 0,5, 0,6 eller 0,7 sammanlagt innan djur avlivas?

Svar: 0.5 – max 10 dagar 0.6 – max 6 days, 0.7- max 3 days. Undantag – under 72 h efter opiodabstiens startat.

29. Inga djur som utsatts för avsevärd svårhetsgrad får överföras till andra försök eller flyttas utomlands enligt regler för återanvändning, L150 11 Kap 16 §. Kommer ni följa det?

Svar: Ja

30. **Mickael/Mingdong** Det finns forskningsresultat (se t.ex.

<https://www.nature.com/news/male-researchers-stress-out-rodents-1.15106>) som visar på att manliga forskare/personal i djurhusen (inkl. kläder från män etc.) påverkar framför allt hanmöss att inte visa smärta? Hur hanterar ni detta?

Svar: Vi är medvetna om detta och har håller oss uppdaterade och diskuterar det i labbet. Dock förväntar vi oss inte att det påverkar våra försök. 1) Samma forskare utför kontrollförsök och experimentella försök och i nästan alla försök utför samma

forskar alla tester djuren inom varje experimentella flöde. 2) Den nämnda studien visar att lukt har den största effekten. I de rutiner vi har i djurhuset byter alla forskare kläder innan man går in i djurhuset. Situationen där tex djuren känner lukt från T-shirt som en person sovit i kan inte förekomma i våra försöksupplägg. Dessutom är experimentell area placerad ovanför en ventilerad bank, vilket minimerar spridning av lukt. 3) Om vi skulle ha ett problem med att resultaten påverkas på ovan sätt skulle mätningar utförda av män påvisa lägre känslighet. Vi får liknande resultat oberoende av kön av försökspersonen.

31. Vilka djurfria metoder har övervägts?

Svar: Vi läser litteraturen och följer nya upptäckter och metoder. Det är möjligt att utföra djurfria metoder för att studera processer inom celler eller mellan två definierade typer av celler. Vi gör sådana försök i labbet och har till och med varit med om att utveckla några av de metoderna. Eftersom syftet med denna ansökan är att studera hur upplevelser påverkar sensorisk perception och utvecklandet av kronisk smärta och mekanismerna bakom detta är okända, så finns inte några djurfria modeller.

32. Vilka källor har använts för att hitta nya innovativ djurfria metoder?

Svar:

<https://www.re-place.be/>

[AnimAlt-ZEBET \(apps.bfr.bund.de\)](https://apps.bfr.bund.de/)

33. Vi påminner om möjligheten till rådgivning och stöd från stiftelsen Forska utan Djurförsök <https://forskautandjurforsok.se/>

Tack!

34. I immobiliseringsexperimenten anges att de kommer att immobilisera mössen i 6 timmar om dagen under flera veckor. Djuren vänjer sig med upprepad immobiliseringen så att varje dag av immobilisering blir musen gradvis mindre stressad av proceduren. Detta kan testas genom att mäta kortikosteronnivåer i musen. Ett bättre paradig är att använda ett variabelt stressparadigm där musen utsätts för olika stressorer på olika dagar. Musen vet inte vad de kan förvänta sig och detta håller stressnivåerna höga. Det finns väletablerade variabla stressparadigmer i litteraturen som fungerar bra.

Svar: Vi tackar och uppskattar denna kommentar från Nämnden gällande experimentella och etiska övervägande i vårt försök! Vi behöver hitta en balans mellan 1) multipla upprepade stress paradig (som later mycket stressande men som i verkligheten som nämns ovan i nämndens kommentar minskar över tid då djuren vänjer sig), 2) flyttande av flera stress paradig, vilket skulle kunna leda till samma eller bättre vetenskapliga resultat under kortare tid, med mindre djur och med mindre påverkan på djuren, 3) Behovet att ytterligare djur för att testa olika varianter för försöksupplägg. Under arbetet med denna ansökan uppmärksammades möjligheten med den eventuella fördelen med att använda variabel stress paradig. Vi hade inte inkluderat det i ansökan eftersom detta försöksupplägg inte använts i studier relevanta för vårt forskningsområde. Dock har vi efter denna kommentar

kritiskt bedömt möjligheten till sådan modell och finner att det skulle kunna vara till fördel både från ett etiskt perspektiv såväl som vetenskapligt och vi skulle vilja inkludera följande kombination av stress paradig, delvis baserade på protokoll vi redan föreslagit.

Vi föreslår följande protokoll:

1. **Immobilitet**- möss placeras i en 50 ml plast rör (eller liknande) med öppning på båda sidorna för andning, max 2 h eller två gånger 1 h per dag (beskrivet i åtgärd 7, men kortare);
2. Porsolt/tvingat simnings test – max 20 min, 2 gånger per dag (såsom beskrivet i åtgärd 7, men kortare).
Följdfråga: Hur många dagar maximalt under de 21 dagar protokollet pågår?

Svar: Tre. Vi kan föreslå ytterligare en begränsning: Porsolt kan inte heller utföras N gånger i specifika stress kombinationer om inte alla andra stress metoder planerade för detta stress schema också planeras att utföras N gånger (dvs inte mindre).

3. **Lutande bur** – Hemburen lutar 45° under 1 h, en eller två gånger om dagen;
4. **Burbyte** – musen placeras i grannmusens bur (efter att grannmusen förflyttats) under 3 timmar, och placeras sedan tillbaka i sin hembur. En gång per dag.
5. **Fukktigt burspån** – Burspån fuktas med vatten i rumstemperatur, musen får vara kvar i buren med fukttigt span i 3 timmar. En gång per dag.
6. **Inget burspån** – Burspån tas bort från buren under 4 timmar eller två gånger under 2 timmar per dag. Musen placeras i en ren bur med span efter det.
7. **Vattenstress** – Burspån tas bort och tillräckligt med vatten (över rumstemperatur för att undvika hypotermi) för att fylla 0.5cm i botten av buren. Musen tas bort, torkas med en handduk och flyttas till en torr bur. En gång upp till 4 timmar eller två gånger under max 2 timmar.

Det finns andra stress protokoll som beskrivs i relevanta rapporter men vi skulle vilja undvika dom eftersom dom antingen är mycket omständiga och/eller svåra att tekniskt genomföra. Dessa inkluderar:

Tass elchock – två gånger, 5 sek var, 1 mA;

Skakning – grupp om fem möss placeras i en plastbehållare och placeras i en orbital skakare under 1 h at 150 rpm;

Social stress – möss introduceras i en bur med en aggressiv mus och efter att den kuvats placeras i en transparent och perforerad plastbehållare, som gör att ytterligare fysisk kontakt inte kan ske, inne i hemburen under 30 min.

Varmluft – möss exponeras för en varm ström av luft från en hårtork under 10 min.

Vitt buller – möss exponeras för 80 db vitt buller under 2-6 timmar.

Rovdjursljud – Uppspelning av rovdjurs ljud nära buren under 3 timmar.

Sekvenser av stress protokoll varierar mellan rapporter, men alla inkluderar 1 till 2 protokoll per dag, under 5 veckor. Det förekommer också variationer mellan tid för varje stressor (i vissa studier rapporteras 1 timme per stressor, emedan andra 4-6 timmar). I alla rapporterade stress protokoll utförs de i en pseudorandomiserad order.

Vi hoppas att vi kan uppnå effekt genom att applicera olika stress protokoll (list ovan 1 till 7), en per dag under max 21 dagar, antingen löpande eller med upp till två dagars paus.

Vi skulle gärna vilja behålla stress protokollet som beskrivs i åtgärd 7 eftersom detta stressprotokoll har använts i tidigare studier av smärta. Dock inser vi att randomiserade stress protokoll kan leda till bättre resultat med kortare exponering av djuren för stress, men vi måste testa det för att kunna veta om det fungerar.

Följdfråga 34b: Tack för att ni är öppna för nämndens förslag. Vi föreslår att ni använder er av den nya paradigmen (beskriven i svar 34 med variabla stress-stimuli) i första hand, av immobilisering i åtgärd 7 i andra hand, och att Porosolt swim test så som det är beskrivet i åtgärd 7 inte används alls. Kommer ni följa det?

Svar: Ja, vi startar med "shuffled" scheme, om det inte fungerar använder immobilization, men vi vill använda Porsolt swim test ifall de tidigare två andra varianterna inte fungerar. Var god och se detaljerat svar under nästa fråga.

Vi vill också säkerställa att punkt 7, Vattenstress, formuleras som:

- 7. Vattenstress** – Burspånnet tas bort och tillräckligt med vatten (över rumstemperatur för att undvika hypotermi) för att fylla 0.5cm i botten av buren. Mus placeras i denna bur en gång upp till 4 timmar eller två gånger under max 2 timmar per dag. Sedan tas musen bort, torkas med en handduk och flyttas till en torr bur.

Tidigare textvariant kan tolkas på olika sätt.

Följdfråga 34c: Porsolt swimtest är kraftigt ångestframkallande och orsakar inlärld hjälplöshet, något som i bästa fall kan vara relevant gällande antidepressiv medicin för mycket svårt deprimerade. Ert syfte är att framkalla stress så förhoppningsvis är det nya variationsparadigmet utan att Porsolt swimtest genomförs tillräckligt. Vi föreslår därför att Porsolt utgår helt i samtliga delar av ansökan. Kommer ni följa det?

Svar. Detta är ett klassiskt test och som också är effektivt för att studera stress, dock i kombination med hjälplöshet och vi skulle gärna vilja behålla det men kan minimera hjälplöshetskomponenten. Mot bakgrund av detta skulle vi uppskatta om kommitteen godkänner följande revision: Maximal simmtid – 8 minuter per session (ursprungligen 30), maximalt antal sessioner per dag- 3 (ursprungligen 4 med max tid för varje repeterad session – 20 min). Maximalt utförd under 3 dagar (samma som tidigare). Såsom separat stress paradigm används det enbart om "shuffled" strategin eller immobilisering inte leder till förväntat resultat. Såsom del av "shuffled" modellen kan det också endast användas maximalt under tre dagar. Vi föreslår således att sikta på att få resultat från de andra modellerna i första hand.

Vi vill sålunda gärna ha kvar detta med ovan begränsningar ifall de andra modellerna inte ger den väntade effekten. Dock vill vi klargöra att om kommitteen har för avsikt att avslå ansökan i det fall

Porsolt inte helt har utgått, så kommer vi förstås att följa förslaget att Porsolt helt utgår i samtliga delar av ansökan.

Följdfråga 34d: Kommer punkterna/stressorerna kombineras och flera utföras samtidigt eller samma dag i variationsparadigmet för pågående stress? Vänligen förtydliga upplägget och verifiera att det endast ska orsaka en mild/måttlig kronisk stress?

Vi utför endast en stressor per dag, maximalt under 21 dagar. Under denna milda/måttliga stress modellen förväntas inte djuren förlora någon vikt. I det fall djuren förlorar 15% eller mer i vikt under försöket klassas stressen som avsevärd och försöket avbryts.

Övriga frågor:

35. Ni använder smärtstillande kräm på svansen på vuxna djur vid AAV injektioner. Varför gör ni inte det på ungar? Vi kan göra det om det inte finns negativ effekt på ungar i samband med smärtstillande kräm. Vi följer alltid vet rekommendationer om de inte hinder oss från att uppnå syfte av experiment.
36. Leverans av ämnen: Ni vill ge ibuprofen 20 mg/kg ip (antar 1 gg/dag). Den rekommenderade dosen i människa är 10 mg/kg (max 4 tabletter per dygn, 200 mg, 75 kg). Varför använder ni en högre dos?

Ibuprofen dos som används för möss varierar i litteratur, vanligtvis ligger i intervall 20-40 mg/kg. Det finns också rapport som visar att hälften effektiv dos i mus är 10 mg/kg och minimal full effektiv dos är runt 20 mg/kg. Det finns också rapport som visar att 50 mg/kg av ibuprofen är inte särskilt effektiv i paraformaldehyde smärta test. Dvs vid sådana olika data kan man hoppas att 20 mg/kg är minimala doser som fungerar i de flesta situationer.

37. Djuren i försöksgrupp 3 verkar genomgå många ingrepp och långvarig smärta (8 mån med artrit eller 3 mån med SNI, detta efter stresstester, kirurgier, administration av substanser och sensoriska tester). Det är många djur som ska ingå i dessa studier (N=1000). Är det möjligt att reducera antalet djur och ändå uppnå statistisk signifikans?

Svar. Enligt gällande regler beskriver vi maximalt antal djur som används med djur. Självklart ska inte alla djur som används i försöksgrupp 3 utföras till alla åtgärder. Nämligen estimerar vi att av de 1000 nämnda djur max 300 ska exponeras till både central mekanism åtgärd och ett av två smärta modeller, andra 700 ska användas för antigen nervskada eller reumatoid artrit modell separat (utan stresstester osv). Dvs 1000 totala djur i denna försöksgrupp är rimligt.

Vi har en ytterligare poäng. Vi vill justera texten angående platspreferens test så att försöket klargörs i sin helhet (s. 21, sista paragraf ovan "3. Randall-Selitto Paw Pressure test"). Ny text är i fet stil:

"Samma försök som beskrivet ovan kan komma att utföras användande substanser (se ovan) istället för Ljus. **Habituering utförs på samma sätt som för "ljus" variant av test, dvs max under 5 dagar.** I dessa fall injiceras känselutlösande ämne **eller ämne enligt beskrivning i åtgärd "leverans av ämnen"** (ta bort: enligt ovan) **och mus placeras** i en av de två lådorna en gång per dag (ta bort: i två dagar) **i max sex dagar** och därefter spåras vid senare dagar djurens förflyttning mellan lådorna. I det fall ämnen orsaka obehag kan detta mätas genom att djuret väljer att vistas i den andra lådan där dom inte har fått substans (eller tvärtom). Denna testvariant är måttlig **om injekterande ämne förväntas att orsaka obehag. Denna test är avsevärd om injektion klassas som avsevärd. Annars klassas test som milda (t.ex. om smärtlindrande ämne injiceras).** Varje två dagar av injektion räknas som en test (dvs t.ex. en hel test med sex dagar injektion räknas som tre tester). Andra sensoriska tester utförs inte under dagen när "träning" (dvs ämne injektion) utförs. Denna test utförs maximalt en gång per djur. Alla begränsningar av injektion antal gäller.

Kompletterande frågor till 10406-2020 inför sammanträde 2020-10-08

Vänligen återkom med svar på beredningsgruppens frågor per epost **senast måndag den 28/9 2020** genom att svara alla CC:ade på mejlet. Eventuella korrigeringar av PVS:en måste ske i e-tjänsten, skickas till föreståndaren för godkännande, och även skickas i PDF-format tillsammans med svaren till Beredningsgruppen. Vi är tacksamma om du även anger ett telefonnummer där du är nåbar den 8/10 kl. 13-16.00 för eventuella frågor som kan uppstå under sammanträdet.

De kompletterande frågor vi önskar svar på är **angivna i röd text**.

Svar: vi har svar i lila text.

1. Finns en utvärdering av 47/13? Vänligen bifoga i så fall.

Svar: Nej, det finns inte. Vi har inlämnat utvärdering för ett antal andra tillstånd som gått ut under de senaste två åren men har inte fått förfrågan kring 47/13.

2. Fanns det några villkor för det etiska godkännandet för 47/13?

Svar: Det fanns 14 villkor, ett av dem var senare ändrad genom ett tillägg (lång bedövning för nervskada modell).

Följdfråga: Vad var villkoren, och är det några av dessa villkor som specifikt hindrat er från att uppnå syftet med er forskning?

Villkor till N 47/13 med kommenterar i samband med nuvarande ansökan:

1. Godkännandet gäller endast för i ansökan angivna stammar. – *Som vi förstår denna regler har ändrats.*

2. Godkännandet gäller endast för klart angivna försöksupplägg enligt kompletteringar till ansökan – *blir standard.*

3. Genotypning ska ske i första hand genom öronklipp, eller om nödvändigt genom svansklipp under anestesi om det görs efter avvänjning - *blir standard.*

4. Beträffande djur med fenotyp ska försöket avbrytas vid 0,3 enligt KI :s mall. – *I vår "huvud" tillstånd 9702-2018 (som fortfarande aktuellt) har vi 0.4 avbrytnings för denna situation och skulle vilja behålla det.*

5. Vid upprepade i.p.-injektioner ska djurets buk palperas och försöket avbrytas vid Peritonit - *blir standard.*

6. Försöket ska avbrytas vid klåda som ger upphov till sår, eller klåda som påtagligt stör djuren under flera dagar.- *gäller*

7. Försöket ska avbrytas vid en viktninskning på 20% eller mer. Vikt ska jämföras med obehandlade kontroldjur. – *Det är inte relevant. Djur minskar inte vikt i denna modell.*

8. CFA får ges endast en gång per djur. – *vi slutade att använda CFA. Karragenan används istället.*

9. Max 3 upprepningar av känslighetstest och max en kombination av två olika känslighetstester med en duration på som mest 10 min/test. – *detta stämmer inte nu och vi jobbar inte under sådana villkor från 2018 (tillstånd 9702-2018).*

10. Max 3 upprepningar av sensorisk stimulitest och max en kombination av två olika stimulitester med en duration på som mest 10 min/test. – *detta stämmer inte nu och vi jobbar inte under sådana villkor från 2018 (tillstånd 9702-2018)*

11 . Vid intradermal injektion ska minsta möjliga volym ges och minsta möjliga nål användas. - *blir standard.*

12. Post-operativ smärtlindring, utom vid minipumpsoperation, ska ges i minst 72 timmar och därefter vid behov. Nämnden rekommenderar en kombination av NSAID och buprenorfin/Temgesic. – *kan inte används*

13 . Miljöberikning ska ges enligt KI:s miljöberikningsplan. - *blir standard.*

14 . Försöket är av avsevärd svårhetsgrad.

3. Kommer avels- och kolonidjur avlivas efter 18 mån eller 6 kullar? Om längre tid är nödvändigt vänligen motivera varför djuren måste hållas så länge.

Svar: Det går bra med 18 mån eller 6 kullar.

4. På sid 7 står följande: "Tid räknas från först måttlig/avsevärd åtgärd, d.v.s. metoder som t.ex. s.c., i.p., p.o. eller milda sensorisk testning sätter inga specifika slutpunkter utan då använder vi slutpunkter för koloni och avelsdjur." Hur tänker ni kring detta då upprepning av t.ex. i.p är av måttlig svårhetsgrad, vilket de andra administreringarna/sensoriska testerna också kan vara om de upprepas ofta. Vänligen ändra och ange tydligare slutpunkter även för dessa försök.

Svar: Om djuren når måttligt eller avsevärd svårighetsgrad är slutpunkt 6 resp 4 månader från dagen svårighet når respektive grad, fast inte för djur i RA modell. I denna modell är slutpunkt 8 månader från LPS-injektion.

Följdfråga 4a: Slutpunkten är den tidpunkt där försöksledaren utgår från att ha uppnått syftet med försöket. För "generiska åtgärder" där slutpunkten kan bli upp till 24 månader (en normal livslängd för en mus på försöksdjursanläggning) innebär detta att ni inte kan säkerställa när under en livstid som syftet med dessa generiska åtgärder har uppnåtts. Det gör det tveksamt vad syftet är. Kan ni utveckla ert resonemang?

Svar: T.ex, för att ha effekt för specifik cell grupp måste djur injiceras med TAM senast när de är 2-3 veckor gamla. Då kan det tar 2-6 månader innan vi börja att använda dem för någon avsevärd åtgärd, t.ex nervsakada eller RA modell som bestämmer ny slutpunkt separat. Vi menar att "generiska åtgärder" används oftast i samband med följande "stora åtgärder" som måste bestämma slutpunkt i första hand. Vi tror att vi kan klara med 14 månader slutpunkt för "generiska åtgärder".

5. Ni anger på s. 12 att ni vill använda djur som riskerar bli blinda på ett eller båda ögonen. Vi föreslår att endast djur som är blinda på ett öga får användas. Kommer ni följa det och begär ni i så fall några fler djur?

Svar: blinda på ett öga, enl ovan är OK.

6. Tåspetsbiopsi ska undvikas om möjligt enligt L150 14 Kap. 8-9§§. Kommer ni enbart använda tåspetsbiopsi (max en tå per djur P4-P7) om musungar ska användas i försök före P7 och inga alternativ är möjliga och att djuren får smärtlindring innan biopsi tas?

Svar: Ja. Vi kommer enbart använda tåspetsbiopsi (max en tå per djur P4-P7) om musungar ska användas i försök före P10 (för att hinna analysera biopsi som tagna P7) och inga alternativ är möjliga och att djuren får smärtlindring innan biopsi tas.

7. 0,5mm tåspetsbiopsi, riskerar det vara mer än yttersta falangen på en tå? Om ja, motivera varför det är absolut nödvändigt att ta mer än yttersta falangen på en tå.

Svar: Vi tar så lite som möjligt men tillräckligt för att kunna göra reproducerbar genotypning. Som vi fattar räcker yttersta falangen för detta.

8. Kommer ni tillämpa bedömningsmall 1B och avbrytningspunkter för mus innan avvänjning? Med undantag för enbart okulär bedömning de första dagarna efter födsel?

Svar: Ja

9. 9 timmar med smärtstimulerande tester låter väldigt påfrestande för djuren. Kan antalet stimuleringstester på en dag minskas?

Svar: Det är fel tolkat. Vi vill uppmärksamma nämnden att djur riskerar att uppleva smärta enbart i de försök med måttlig och avsevärda tester. Vi har klassat måttlig svårighetsgrad som den grad som uppstår i alla försök där stimulus appliceringen upphör så snart stimulus når nivå som orsakar obehag, vilket leder till en reaktion hos djuren. Det betyder att "smärtstimulering" som kan fortgå längre än några sekunder bara är aktuell för avsevärda test. Den andra moment inom 9 timmar kommer från experimentella schema när några djur sitter på arena ganska lång tid för habituering och genom att test utförs i turordning till olika djur, dvs varje djur utsätts inte för stimuli mer än 5% av total experimentala tiden. Den större delen av de 9 timmarna sover (eller nästan sover) djuren på arenan.

Följdfråga 9b: Är det möjligt att djuret har någon typ av påverkan (genetiskt eller annan) att de inte klarar av att dra undan tasserna i tid och får skador på tasserna vid vissa av de sensoriska testerna?

Svar: För att undvika denna situation har vi i alla våra tester beskrivit slutpunkt. Vi har nu gått igenom alla testbeskrivningar igen och kan addera följande begränsningar:

- * pinprick- maximalt 6 applikationer (3 per tass) i de fall djuren inte svarar på stimuli.
- * hot plate – avbrytningstiden är halva tiden som är listad för detta försök ifall djuret inte uppvisar någon reaktion. Tex, avbrytningstid vid 48°C – är 1 min ifall djuret inte reagerar på stimuli. Denna begränsning är inte relevant för kyla eftersom den kyla vi applicerar inte är så låg utan motsvarar vad dom upplever då dom tex springer på snö vilket inte leder till någon skada.

10. Totalt 45 smärtstimulerande tester låter mycket för ett enskilt djur, liksom upp till 6 tester på en dag. Kan antalet minskas?

Svar: Som beskrives ovan, i svar 9, djur upplever inte smärta i samband med ringa och milda test (8 test av 17). Under måttliga test (7 av 17 test) kan djur uppleva

smärta som mest under bara några sekunder. Det är bara under 2 avsevärda (2 av 17) test som djur kan upplev smärta längre. 6 test per djur/dag utförs extremt sällan, max under två dagar per djur och på mindre än i 5% av djuren. Under de senaste åren har vi optimerat protokollet och som har lett till ovan minskning och vi kan inte minska det ytterligare. Dock vill vi att nämnden observerar att dessa är maximalt antal test. För de flesta djur blir det mindre, 3 eller 4 test per dag under mindre än 10 dagar.

11. Hur länge kan djuren som längst vara utan mat och/eller vatten under en testdag?

Svar: 6 timmar, men i de flesta fall är det kortare. 1) Vi föreslår i ansökan att vid kronisk fysisk aktivitet att djuren har en paus med tillgång till vatten och mat var 4e timme. 4 timmars begränsning fungerar inte här (sensorisk testning) eftersom habitueringen kan ta upp till 2 timmar (tex, på nätgolvet) och sedan utförs flera tester på den arenan. Detta kan sammantaget ta upp till 6 h. Om vi under denna tid skulle sätta djuren tillbaka i buren för en paus med mat och vatten så måste djuren habitueras igen till arenan. 6 timmar gäller således den maximala tiden i samma arena. Vi vill här påminna om att sensoriska testerna utförs dagtid, då djuren normalt sover större delen av tiden och vatten och matintaget är minimalt. 6 timmars med begränsning av mat under denna tid har liten eller obefintlig påverkan på djuren.

12. Hur länge riskerar djuren känna smärta efter kemisk känslighetstest? Kommer djuren få smärtlindring efter 90 min vid kemiska känslighetstest (dvs efter 90 min samling av data avslutats)?

Svar: Kemiska substanser skiljer sig åt. Capsaicin och formalin har en effekt upp till ca 30 min resp 90 min emedan karrageenan (klassisk inflammatorisk modell) har en effekt upp till 48 timmar eller längre. Ja, djuren får smärtlindring efter att data har inhämtats i de fall kvarvarande spontan smärtbeteende observeras efter att datainhämtningen är klar. Datainsamling för karrageenan utförs under upp till 58 timmar efter administrering av substans, så smärtlindring ges inte innan denna tidpunkt. Om smärtlindring ges i samband med sensorisk testning, så räknas inte injektionen av smärtlindring in i det totala tillåtna antalet injektioner, eller så ökar det totala tillåtna antalet tillåtna injektioner med samma antal som antalet administrerade smärtlindringar i samband med kemisk känslighetstest.

Följdfråga 12b: Vänligen motivera varför de sensoriska testerna med avsevärd svårhetsgrad krävs för att uppnå syftet med försöket.

I alla våra studier behöver vi utföra olika test för att förstå hur känsligheten förändras. Kemisk känslighet är en viktig tyd av sensorik och kan bara testas genom kemiska känslighetstest. I motsats till de andra testen klassar vi dem som avsevärda. Det mest svåra testet, carrageenan är den enda modellen vi använder för inflammatorisk smärta. Vi mäter i detta test känsligheten under den inflammatoriska processen. Detta tar upp till

tre dagar och analys av mekanismer kring inflammatorisk smärta kan inte utföras utan detta eller liknande test. Inflammatorisk smärta är en kliniskt mycket viktig typ av smärta.

Avsevärd variant av Hot/Cold plate: när djur utsätts för obehaglig temperatur uttrycker de två typer av beteenden, som förmedlas av två olika neuronala vägar. Den ena typen av beteende (t.ex. tass lyftning) är en reflex vilket kommer först under obehaglig stimulering och antas förmedlas av ryggmärgsnervbanor (dvs lokala reflexvägar i ryggmärgen). Den andra typen av beteende (t.ex. tass "bevakning" och slickning) kommer senare, och kallas för "coping" dvs omhändertagande beteende och involverar andra populationer av celler i ryggmärgen och också specifika nervcellspopulationer i hjärnan. De två olika typer av beteende visar därför inblandning av olika (nerv) cells populationer och signalbanor och det är viktigt att de övervakas tillsammans, även om "coping" – beteendet uppträder med en viss fördröjning, vilket innebär att djur måste stanna längre kvar på plattan. Detta är standard för att registrera "coping" beteende och det finns ingen annan metod för att urskilja detta beteende eftersom det visar sig med en viss tidsförskjutning (dvs efter "reflex" beteende) under exponering till obehaglig temperatur.

Följdfråga 12c: Närvarar veterinär vid de avsevärda sensoriska testerna?

Ja, vi alltid informera vet om kommande avsevärda procedur och oftast vet är på plats åtminstone under första par gånger.

Följdfråga12d: Är det möjligt att korta ned tiden för datainsamling vid test med karrageenan så att djuren kan få smärtlindring tidigare?

Nej, vi diskuterade denna fråga i labbet innan vi svarade fr.12. Vi skulle vilja behålla maximal 58 timmar efter injektion. Ofta används 72 h och vi har redan minskat det med 14 h.

13. Om djuren har fortsatt klåda efter att testtillfälle avslutats, avlivas djuren då?

Svar:

Om djuren har kontinuerlig klåda 90 min efter test sessionen avslutats injiceras smärtlindrande eller appliceras Xylocain kräm maximalt två gånger och ifall klåda fortsätter efter detta avlivas djuret.

14. Hot/cold plate test. Det räcker med att ett djur är påverkat 20 min efter avslutat test för att klassificera det som avsevärt. All svårhetsbedömning ska utgå från den högsta påverkan ett enskilt djur kan uppnå. Ok?

Svar: Ja, individuell svårhetsgrad avgörs av det högsta som ett enskilt djur påverkas av under hela experimentella flödet. Dock vill vi påpeka följande: På sida 24 i ansökan beskriver vi i detalj hur svårhetsgrad bestäms för varje djur för de olika varianterna av hot/cold plate test, där vissa är avsevärda och andra måttliga. Där framgår att avsevärd klassas som sådan då det finns ett kvarvarande, icke-provocerat påverkan på beteende 20 min efter att djuret är tillbaka i omgivande temperatur och svårhetsgrad är måttlig då något kvarvarande beteende inte finns hos åtminstone 80% djuret. Vi kommer inte att utföra testerna som bestämmer svårhetsgrad på

alla djur i experiment utan det görs först på ett mindre antal och alla djur därefter kommer att klassas som måttlig eller avsevärd baserat på de resultaten.

Följdfråga 14b: Om ett djur i försök riskerar vara påverkat 20 min efter avslutat test ska nämnden klassificera testet som avsevärt. Det medför rimligtvis att det räcker med att ett djur i experimenten för klassificering av testet är påverkat 20 min efter avslutat test för att klassificera det som avsevärt. Kan ni följa det då det underlättar om ni och nämnden har samma klassificering?

Svar: Det går bra. Om åtminstone ett djur från 8 testad visar oprovocerade beteende 20 min efter sensorisk testning slutar då klassificeras test som avsevärd. Annars klassificeras test som måttligt.

15. Kommer de djur som har/riskerar fortsatt påverkan efter avslutat hot/cold plate test få smärtlindring?

Svar: Ja, i de fall minst 2 av 6 djur uppvisar oprovocerat beteende (lyfter eller skakar tassan) 20 min efter djuret tagits bort från hot/cold plate, så klassas testet som avsevärt och alla djur som genomgår samma variant av test i samma experimentella flöde får smärtlindring en gång efter att testet avslutats. Dock vill vi påpeka att vi inte tror att detta kommer att behövas.

16. Är det verkligen nödvändigt med ett avsevärt och två måttliga test på en och samma testdag? Kan ni inte begränsa till att om avsevärt test genomförs ska inte djuren genomgå något annat den testdagen och om måttligt test genomförs så får det bara kombineras med ett mildt eller max ett ytterligare måttligt test samma dag?

Svar: Svar: Det är relevant om cold/hot plate test varianterna som tillåter mätning av så kallat nociceptivt beteende (av måttlig/avsevärd karaktär) är klassat som avsevärt (se p. 24 kriterier, see svar 15 ovan) eller måttligt (som är det avsedda testet). Om testet är måttligt, så är det enda avsevärda testet vi behöver utföra kemisk känslighetstest och då kommer max antal avsevärda test per djur bli 3 (inte 12). Avsevärda test utförs endast som det sista tested under dagen. Generellt sett utförs testen i block under samma dag eftersom känsligheten förändras över tid och det är viktigt att ha mätningar av olika typer av känslighet under samma dag för att kunna jämföra resultaten. Det är således vetenskapligt viktigt att kunna göra olika mätningar under samma dag.

Följdfråga 16b: Finns det inte en stor risk att resultaten påverkas av att djuren utsatts för smärtstimuli samma dag så att de reagerar mer?

Svar: nej, det tror vi inte. För att undvika sådan risk beskriver vi på s 25 av ansökan vilka test kan inte kombineras på samma djur/dag: "1) PAM; Randall-Selitto; Kläm test
2) Icke smärtsamt aceton test; Kylsmärttest; Tröskeln för termiskt obehag (för kyla); 3) Radiantheat; Tröskeln för termiskt obehag (värme); Hot plate." Andra test skulle inte

påverka varandra. Kemisk känslighet test alltid utförs sist i på samma dag om kombineras med andra test.

17. Max 12 avsevärda test/djur. Kan detta minskas?

Svar: Se svar 16. Vi hoppas att nocifensiva testet (långa varianten) av cold/hot plate kommer att klassas som måttlig. Vi kommer i detta fall behöva max 3 avsevärda test (kemiska test). Om mot förmodan detta test visar sig som avsevärd kan vi inte begränsa oss till färre än 10 avsevärda test eftersom nocifensiva svaret är viktigt att kunna mäta för att förstå den normala känsligheten och det behöver upprepas för att förstå dynamiken/förändringar av känsligheten.

Följdfråga 17b: Kommer max 10 avsevärda test per djur genomföras?

Svar: OK, max 10 avsevärda test.

18. Åtgärd 5 och 6, kirurgiska ingrepp. 2-3 cm stora snitt är ganska mycket på mus och de bör väl få smärtlindring minst två dygn post-op och därefter vid behov?

Svar: Vi anser att muskel och benborttagning påverkar djuren mer än snittets storlek och detta påverkas inte nödvändigtvis av snittets längd. I samband med discussion med nämnden för vår nyligen godkända 2903-2020 har vi reviderat våra lab rutiner för att utföra extra vård och smärtlindring vid denna typ av kirurgi. Det framfördes att läkning av ett kirurgiskt hudsnitt går mycket fort. Normalt är stygnen intakta under 3 dagar och faller bort vid 7 dagar efter kirurgin och huden är då läkt. Efter diskussion med forskare med många års erfarenhet av sådan kirurgi skall minimal anaestesi för kirurgin vara: i.t (med hud snitt) and l.sp (lumbar) – en systemisk anaestesi åtminstone nästa dag efter ingrepp. Vi påpekar också att i.t. normal ges utan incision i huden. Sålunda tolererar djuren väl i.t./i.sp vid ansökt kirurgi och vi hoppas att nämnden tillgodogör sig vår expertis i denna fråga. Vid behov ges förstås ytterligare anaestesi.

Följdfråga 18b: Notera att vi efterfrågar post-op behandling med analgetika (smärtlindrande), inte förlängd anestesi. Ni har angett att ni ger karprofen om ett djur uttrycker tecken på smärta. Vi rekommenderar att ni ger post-op smärtlindring i 2 dygn efter kirurgi oavsett tecken. Kommer ni ge post-operativ smärtlindring i 2 dygn efter kirurgi?

Answer: OK.

19. Resuturering får ske högst en gång. Ok?

Svar: OK.

20. Kommer ni tillämpa bilaga 2 till bedömningsmallen, Ansiktsuttryck kopplade till smärta före, under och efter testtillfällena, och med undantag för post-op då

smärtlindring ges, avbryta försök/avliva djur vid tecken på avsevärd smärta eller måttlig smärta under längre tid (mer än tre dagar)?

Svar: OK

21. Många människor mår illa av opiater, finns det risk för detta även hos möss? Hur säkerställer ni validiteten i försöken i så fall? Finns det alternativ till denna metod som är mildare för djuren?

Svar: Det är inte förväntat att djuren mår illa av opiater. Djur som uppenbarligen är sjuka under opioidexponeringen avlivas. Den enda alternativa metoden för att inducera opioidberoende är att inplantera en subdermal morfin "pellet". Dock rekapitulerar inte denna modell människans opioidberoende eftersom exponeringen är stadig och kontinuerlig. I människa konsumeras opioider intermittent, med timmar mellan intaget och med ökade mängder då tolerans byggs upp. Detsamma gäller djur, administrering i musmodellen på det föreslagna sättet leder till större tolerans och snabbare utveckling vilket visar att musmodellen rekapitulerar situationen hos opioidberoendet hos människor.

- 22. Vi föreslår att ni särskilt överväger och undersöker alternativa modeller/upplägg för stress, fysisk aktivitet och sömnbrist. Och väljer mindre plågsamma och mer relevanta modeller som mer liknar den stress, depressions- och sömnbristnivå människor med smärta har. De åtgärder ni föreslår är samtliga av avsevärd svårhetsgrad och tillsammans med övriga åtgärder av avsevärd svårhetsgrad, där flera dessutom kommer upprepas och kombineras, medför en allt för stor påfrestning på djuren och strider mot Djurskyddsförordningen 7 Kap. 9§. Se nedan några skäl för detta:**

- a) Max antal Porsolt/FST/djur som centrala nämnden godkänt är 4 st och de är på max 15 min vardera. 21 st FST upp till 30 min är alldeles för mycket. Kontinuerlig immobilisering kommer djuren att anpassa sig till och därmed nå lägre stress efter hand. Titta gärna på möjliga upplägg/paradigm med varierande stressorer istället för att uppnå mild/måttlig depression/stress. Sådana upplägg/paradigm förekommer bl.a. inom depressionsforskning.

Svar: Svar: Vi har tittat på kronisk varierande stress paradigm men detta har inte använts för smärtstudier. I motsats så har effekten av kronisk och akut immobilisering på smärta studerats omfattande. Dock har vi efter detta förslag av nämnden beslutat att testa variabel stress och beskriver detta paradigm som ett förslag till fråga 34.

- b) 12 timmar på löpband utan mat OCH vatten medför en väldigt stor påverkan på möss på flertalet variabler som utöver djurens lidande även riskerar påverka era möjligheter att tolka resultaten. 5 min paus för att äta är för kort tid och djuren hinner inte tillgodogöra sig näring till musklerna, dessutom ska djuren få elchocker och vara i rörelse vilket ytterligare försvårar ämnesomsättningen. Med mössens snabba ämnesomsättning motsvarar nog en så lång tid med forcerad aktivitet och

utan mat flera dygn för en människa. Vilka andra alternativa åtgärder kan användas för att uppnå sömnbrist/depression? Är det t.ex. möjligt att istället ändra på dygnsrytm och belysningstider, blinkande ljus etc.?

Svar: Ja, vi instämmer att 12 h utan vatten påverkar djuren, men vi har inte föreslagit längre tid än 4 h. Vi har också försökt hitta information som visar att 5 minuter är för kort paustid för att äta och dricka men hittar inte någon dokumentation som visar att det är för kort. Om nämnden har fakta och är säker på detta, så kan vi öka pausen till 10 min mat/vatten paus var 4e h. Vi hoppas också att vi kommer att kunna minska spring protokollets längd från 12 till 10 timmar per dag. Andra rapporterade och etablerade metoder för sömndeprivering inkluderar: Blomvasmetoden (möss placeras i en behållare fylld med ca 1 cm vatten, och en liten plattform för att hålla sig torr). Plattformen är så liten att musen kan undvika vattnet men att den inte kan ligga ner; Nya objektmodellen där ett nytt objekt eller en knackning på burens presenteras varje gång musen håller på att somna. Den första modellen förhindrar att musen ligger under experimentet och därmed har en större stress-effekt än treadmill (där musen kan ligga ner då och då under kortare perioder av ca 5 sekunder per gång). Den andra metoden involverar EEG och EMG apparater för att kunna mäta vakenhet (baserat på hjärn eller muskelaktivitet), vilket skulle involvera invasiv kirurgi. Av dessa orsaker verkar treadmill vara den minst stressande metoden för möss. Vad gäller elektiska stöten så vill vi nämna att musen lär sig fort och att det är sannolikt att antalet stötar inte blir fler än 4 st under en tid av flera timmar. Sålunda kommer stötarna inte bidra till minskad möjlighet för intag av vatten och mat. Men som nämns ovan kan vi öka pauserna till 10 min.

Studien av E G Marchant , R E Mistlberger. *Physiol Behav.* 1996 Aug;60(2):657-63 indikerar att treadmill paradigm inte orsakar påtaglig stress. Doms använde sig av löpning i springband under 3hr varje dag (10 min mat/vatten paus), 6 dagar/vecka under 7 veckor. I dessa försök använde dom sig av en hastighet som är 5x snabbare än den vi ansöker om (16m/min vs. 3m/min), och total distans var 2.88km (vs. 2.16km i vårt 12hr protokoll). Författarna rapporterar ingen stress-relaterad fenotyp i detta protokoll.

Följdfråga 22 b2: Är det möjligt att öka viloperioden till 10 minuter och att ni erbjuder näringsgel på burgolvet under vilopauserna?

Vi vill starta vårt svar till fråga 22 med att påminna om det som finns skrivet på sidan 33 i ansökan: "Detta test är designat för att simulera utdragen lågintensitet träning och leder inte till djurens utmattning. Springhjulets hastighet är låg, bara 5cm/s (< 0.2 km/h), vilket är ca 6% av musens snitthastighet då den springer frivilligt. Den totala distansen (2,16 km) är bara drygt 20% av den som möss springer i fångenskap per natt. Både hastighet och längd som musen springer är således helt inom dess normala fysiska aktivitet." Sålunda vill vi klargöra att både hastighet och avstånd är väldigt låg, till och med för en mus. Det är inte utmattande, inte ens intensivt, det motsvarar en promenad.

Vi skulle uppskatta om den första pausen begränsas till 5 minuter. Om djuret inte äter och/eller dricker under denna första paus ökar vi nästa paus till 10 minuter för att försäkra oss om tillgång till vatten och mat. Under en paus (särskild 10 min) kan vi behöva försäkra oss om att djuren inte somnar genom att tex knacka på burens eller peta på djuret. Vi hoppas också att nämnden samtycker att vi kan begränsa en paus till 5 min om den följer efter ett träningsavsnitt på 3 h eller kortare. Vi kan göra näringsgel tillgängligt på burbotten såsom ni

rekommenderar även om vi inte tror att det behövs med tanke på att träningen inte är intensiv.

Följdfråga 22 b3: 10 timmar pågående aktivitet för mus med snabb ämnesomsättning motsvarar en mycket längre tid för människa. Om syftet är att undersöka lågintensitetstränings påverkan på smärta borde väl en kortare tid av aktivitet vara mer relevant? En människa tränar väl sällan mer än någon timme per tillfälle?

Denna tid krävs för sömndeprivationsstudien och vi behöver därför också använda denna tid för kontrollförsök under vakna timmar. Vi skulle kunna (och kommer troligen) använda en kortare tid för experimenten där vi studerar låg intensitetsträning. Vad gäller relation till träning hos människa så motsvarar detta promenad/vandring vilket utförs av många under flera timmar till en hel dag.

Följdfråga 22 b4: Har ni undersökt hur lång tid det tar för en mus att bilda glykogen efter matintag som kan användas vid fortsatt aktivitet på motionshjul/löpband? Musen kanske också behöver några minuter innan matintag och vätska kan intas samt vila/återhämtning innan de kan börja springa igen direkt efter intag? Vänligen se över om protokollet för både pågående fysisk aktivitet samt sömnbrist kan justeras ytterligare.

I likhet med uthålligheten hos vältränade atleter så har musen en reducerad tillgång till muskel glykogen som ju snabbt tar slut och inte återskapas under träningen. Musens glykogen som används vid arbete lagras i huvudsak i levern och detta glykogenet kan förnyas också under arbete ifall kolhydrater finns tillgängligt. Med de 5-10 minuter paus för födo- och vattenintag varje 4 timmar ska det finnas tillräckligt med tid för att säkerställa att glykogendepåerna förnyas för fortsatt arbete. Var vänlig och notera att detta gäller lågintensitetsarbete som motsvarar att ta en promenad.

- c) Nämnden brukar inte godkänna elstötar med mer än max 0,5 mA för mus! Och max 3 stötar per testtillfälle. Om absolut nödvändigt kan strömstyrkan få höjas till 0,7mA för mer resistent stammar. Vänligen undersök andra försöksupplägg/åtgärder som inte omfattar elstötar och/eller löpband/motionshjul.

Svar: Vi skulle mycket gärna vilja följa denna begränsning vad gäller max anta ock ström, men vi skulle isåfall kunna hamna i en situation där det inte är tillräckligt för att hålla djuren på springbandet och då omintetgörs hela experimentet. Denna oro bekräftas av en postdoc i labbet som har utfört denna typ av försök i sitt tidigare laboratorium. Han menar att så låg ström och begränsade antal stötar, speciellt under de första inlärnings sessionerna, gör att mössen väljer att inte gå tillbaks till springbandet. Vi undrar vilken typ av försök som nämnden har beviljat max 0.5 mA and 3 electriska stötar? Intuitivt så används dessa antal stötar i försök som är maximalt 30 min, 10 timmar långt försök kräver fler stötar, således bör antalet stötar anpassas till längden av experimentet till viss grad. Vi föreslår att vi börjar med att använda max antal stötar som 6 och max ström 0.7 mA för den första sessionen och max 3 stötar (samma ström) under följande sessioner. Om det inte fungerar i fler än 20% av djuren (dvs djur återvänder inte till treadmill) kan båda parametrarna ökas (max elstöt 8 för första sessionen och 5 efterföljande sessioner, max 1 mA, efter en diskussion med veterinär och/eller DO). Var god att också se motivation för strömstyrka och antal som behövs under p. 32-33.

Följdfråga 22 c2: Kan ni börja med ännu lägre elstötter (0,2 mA) för både pågående fysisk aktivitet och sömnbrist och se om det fungerar och endast höja till 0,5mA om nödvändigt? 0,7mA får endast användas om ni ska använda någon stam som av någon anledning är mer resistent och endast i första sessionen samt max 3 stötter. Strömstyrka på 1mA eller mer ska ej användas på mus. Kommer ni följa det?

Vi kan börja med 0.2mA, men vi tror inte detta kommer att fungera såsom vi påtalade tidigare. För att öka möjligheterna till att sådan låg spänning fungerar kan vi behöva öka max antal stötter till 6 i alla sessioner, eftersom mössen då inte lär sig lika snabbt, sålunda $6 \cdot 7 = 42$ maximala stötter per mouse (bara för 0.2 mA).

Om ovan protokoll inte fungerar (vilket vi dessvärre tror) behöver vi öka till 0.5mA, med 6 stötter maximalt under den första sessionen och 3 för följande försök med ett maxtotalantal av 20.

Om detta inte fungerar ökar vi till 0.7mA och använder en begränsning av max 3 stötter för alla sessionen (inkl första), såsom föreslaget av kommitteen. Om detta inte fungerar kommer vi att behöva 6 stötter under första sessionen och 3 följande med max total antal 20.

Maximal ström som vi vill ha möjlighet att använda är 0.8 mA med antal maximala stötter (5/3/20). Vi hoppas att detta inte ska vara nödvändigt och använder det endast om de lägre spänningarna (0.5 and 0.7 mA) inte fungerar.

Försöksprotokollet att gradvis öka spänningen tillåter oss att bestämma minimalt antal stötter och gör att vi inte utsätter djuren för onödigt lidande eller orsakar att försöket misslyckas.

Följdfråga 22 c3: Kan ni använda max 6 stötter den första dagen och därefter max 3 stötter per session samt totalt max 20 stötter för samtliga sessioner (både försök med pågående fysisk aktivitet och sömnbrist)?

Svar: Vi tror att vi kan utföra försöken med dessa begränsningar om vi tillåts att använda 0.5 mA and eventuellt 0.7 mA (om 0.5 mA inte är tillräckligt). Dock kommer denna begränsning troligen inte att fungera om vi inte kan gå över 0.5 mA för vissa av musstammarna.

23. Hur kommer åtgärderna 6-9 och 10 i försöksgrupp: centrala mekanismer i normal känslighet kombineras med andra tester/övriga delar av ansökan?

Svar: Var snäll och se bilaga 1, båda sidor. Djur som används i denna grupp används inte i nästa försöksgrupp, "centrala mekanismer i kronisk smärta". I denna grupp ska vi studera hur olika central mekanism (CM) upplevelser (som åtgärder 6-9) påverkar normal känslighet. Vanliga kombinationer av planerade experiment kan beskrivas som följande:

- I. Djur testas för sensoriska tester t.ex. 2-3 dagar (baslinje etablering). Då utsätts djur till CM upplevelser (en av åtgärder 6-9). Senare testas djur igen några dagar (sensoriska test) för att se effekt på normal känslighet.
- II. Samma som ovan men åtgärd 6-9 kombineras med injektion av tamoxifen (eller anda ämne som aktiverar specifik gen uttryck eller funktion t.ex DNA

rekombinase). Denna variant markerar specifik cellgrupp som manipuleras (aktiveras alt bromsas) under senare sensoriska test med injektion av CNO eller andra specifika ämnen.

- III. Djur testas för sensoriska tester 2-3 dagar (baseline etablering). Kombination av två samma eller olika CM åtgärder (dvs 6-9 plus 10). Den första CM åtgärden (6-9) kombineras med tamoxifen (TAM, eller andra ämne med samma syftet). Den andra CM åtgärd (10) kan utföras utan TAM (då terminernas djur några timmar senare) eller med TAM (eller liknande), då utsätts djur senare till få sensoriska test.

24. Hur kommer åtgärderna 7-12 i försöksgrupp: centrala mekanismer i kronisk smärta kombineras med andra tester/övriga delar av ansökan?

Svar: Var snäll och se bilaga 1, båda sidor. Djur som används i denna grupp används inte i försöksgrupp, "centrala mekanismer i i normal känslighet". I denna grupp ska vi studera hur celler som involveras/aktiveras av olika central mekanism (CM) upplevelser (som åtgärder 7-10) påverkar utveckling av kronisk smärta modeller. Vi planerar att utföra följande experimentellt flöde i denna försöksgrupp

- I. Djur testas för sensoriska tester t.ex. 2-3 dagar (baslinje etablering). Då utsätts djur till CM upplevelser (en av åtgärder 7-10) och detta kombineras med t.ex. TAM injektion (för att markera specifika celler). Senare utsätt djur till en av två smärta modell (åtgärd 11 alt 12). Senare utsätts djur till sensoriska test. Både smärta modell utveckling samt sensoriska testning kan kombineras med injektion av t.ex CNO för att aktivering/inhibering av cellpopulation som markeras under åtgärder 7-10.

Således, CM åtgärd i denna grupp utförs max en gång och alltid innan smärtmodell. Sensorisk test kan utföras innan CM åtgärd (7-10), mellan CM (7-10) och smärt modell åtgärd (11-12) eller efter smärt modell.

25. Åtgärd 12 nervskada. Är det möjligt att ge djuren systemisk smärtlindring innan operation/skada samt post-op, så att djuren är smärtlindrade minst 48 timmar efter op?

Svar: Nej, det är tyvärr inte möjligt. För att nervskade modell ska utvecklas behövs nervaktivitet. Systemisk smärtlindring innan operation är det som kan användas maximalt.

Följdfråga 25b: Kommer djuren få systemisk smärtlindring pre-operativt så att de är smärtlindrade den mest akuta fasen vid uppvaknande, minst 12 timmar (länge om möjligt)?

Svar. Ja djur får det pre-operativt.

Följdfråga 25c: Hur länge har den pre-operativa smärtlindringen effekt post-operativt?

Svar: Djur har pre-operativa smärtlindringen effekt post-operativt åtminstone 12 timmar.

26. Förväntas samtliga djur efter nervskada få håla? Annars bör väl avbrytningspunkten vara sammanlagt vid 0,4? Ni har ju begärt undantag för att avliva vid 0,4 på enskild parameter vid håla. Motivera annars varför högre sammanlagd avbrytning krävs.

Svar: Det stämmer att djur efter nervskada har vanligtvis inte håla. Men vi kan inte utesluta att djur efter centrala mekanismer åtgärd kan reagera starkare på nervskada. Så, vi skulle vilja behålla ökat avbrytningspunkt för djur som utsätts för både central mekanism åtgärd och nervskada.

Följdfråga 26b: Om djuren skulle reagera starkare efter nervskada, på vilket sätt kan det yttra sig då? Vilken poäng förväntas i så fall och hur länge?

Svar: Svår att veta i förhand, men mest logisk att det blir håla för maximal två veckor. Kraftig håla ger 0.4 i parameter "Rörelse och kroppshållning". Dvs avbrytningspunkt förhöjning under två veckor efter nervskada (om kombineras med "central mekanism" åtgärd) är: total poäng 0.8 p om 0.4 kommer from håla. Djuren också avlivas om de når 0,4 på en enskild parameter med undantag av kroppsrörelse störning (håla).

27. Är det möjligt att välja en artritmodell som ger lägre artritsscore, alternativt avbryta vid lägre total artritsscore? Förslagsvis avbryta vid 0,8 sammanlagt eller 0,4 på enskild parameter, direkt vid mer än 35 poäng eller vid 30-34 poäng efter 10 dagar?

Motivera annars varför högre lidande är absolut nödvändigt.

Svar: Antikropps-inducerade artriten som vi använder är mindre svår än den vanligtvis använda artrit modellen med kollagen-inducerad artrit (CIA). I vår modell är den kliniska påverkan (inflammation) lägre och kortare. Vi kan sätta slutpunkt till 0.8 total poäng eller 0.4 som individuell parameter. Dock behöver vi såsom vi beskriver i ansökan ett undantag: avbrytningspunkt behöver vara 1.2 48 h efter LPS injektion (LPS injektion kan leda till feber liknande symptom men återhämtar sig inom 48 timmar). Om mössen får artrit poäng mer än 35 (maximum 60), så kan djuren avlivas såsom föreslaget. Försöket avbryts också om djuren har mer än 30 under 14 dagar.

28. Om sammanlagd avbrytningspunkt är 0,8 (ej enbart artritförsök) hur länge kan djuren ha 0,5, 0,6 eller 0,7 sammanlagt innan djur avlivas?

Svar: 0.5 – max 10 dagar 0.6 – max 6 days, 0.7- max 3 days. Undantag – under 72 h efter opioidabstiens startat.

29. Inga djur som utsatts för avsevärd svårhetsgrad får överföras till andra försök eller flyttas utomlands enligt regler för återanvändning, L150 11 Kap 16 §. Kommer ni följa det?

Svar: Ja

30. **Mickael/Mingdong** Det finns forskningsresultat (se t.ex. <https://www.nature.com/news/male-researchers-stress-out-rodents-1.15106>) som visar på att manliga forskare/personal i djurhusen (inkl. kläder från män etc.) påverkar framför allt hanmöss att inte visa smärta? Hur hanterar ni detta?

Svar: Vi är medvetna om detta och har håller oss uppdaterade och diskuterar det i labbet. Dock förväntar vi oss inte att det påverkar våra försök. 1) Samma forskare utför kontrollförsök och experimentella försök och i nästan alla försök utför samma forskare alla tester djuren inom varje experimentella flöde. 2) Den nämnda studien visar att lukt har den största effekten. I de rutiner vi har i djurhuset byter alla forskare kläder innan man går in i djurhuset. Situationen där tex djuren känner lukt från T-shirt som en person sovit i kan inte förekomma i våra försöksupplägg. Dessutom är experimentell area placerad ovanför en ventilerad bank, vilket minimerar spridning av lukt. 3) Om vi skulle ha ett problem med att resultaten påverkas på ovan sätt skulle mätningar utförda av män påvisa lägre känslighet. Vi får liknande resultat oberoende av kön av försökspersonen.

31. Vilka djurfria metoder har övervägts?

Svar: Vi läser litteraturen och följer nya upptäckter och metoder. Det är möjligt att utföra djurfria metoder för att studera processer inom celler eller mellan två definierade typer av celler. Vi gör sådana försök i labbet och har till och med varit med om att utveckla några av de metoderna. Eftersom syftet med denna ansökan är att studera hur upplevelser påverkar sensorisk perception och utvecklandet av kronisk smärta och mekanismerna bakom detta är okända, så finns inte några djurfria modeller.

32. Vilka källor har använts för att hitta nya innovativ djurfria metoder?

Svar:

<https://www.re-place.be/>
[AnimAlt-ZEBET \(apps.bfr.bund.de\)](https://www.re-place.be/)

33. Vi påminner om möjligheten till rådgivning och stöd från stiftelsen Forska utan Djurförsök <https://forskautandjurforsok.se/>

Tack!

34. I immobiliseringsexperimenten anges att de kommer att immobilisera mössen i 6 timmar om dagen under flera veckor. Djuren vänjer sig med upprepad immobiliseringen så att varje dag av immobilisering blir musen gradvis mindre stressad av proceduren. Detta kan testas genom att mäta kortikosteronnivåer i musen. Ett bättre paradigm är att använda ett variabelt stressparadigm där musen utsätts för olika

stressorer på olika dagar. Musen vet inte vad de kan förvänta sig och detta håller stressnivåerna höga. Det finns väletablerade variabla stressparadigmer i litteraturen som fungerar bra.

Svar: Vi tackar och uppskattar denna kommentar från Nämnden gällande experimentella och etiska övervägande i vårt försök! Vi behöver hitta en balans mellan 1) multipla upprepade stress paradig (som later mycket stressande men som i verkligheten som nämns ovan i nämndens kommentar minskar över tid då djuren vänjer sig), 2) flyttande av flera stress paradig, vilket skulle kunna leda till samma eller bättre vetenskapliga resultat under kortare tid, med mindre djur och med mindre påverkan på djuren, 3) Behovet att ytterligare djur för att testa olika varianter för försöksupplägg. Under arbetet med denna ansökan uppmärksammades möjligheten med den eventuella fördelen med att använda variabel stress paradig. Vi hade inte inkluderat det i ansökan eftersom detta försöksupplägg inte använts i studier relevanta för vårt forskningsområde. Dock har vi efter denna kommentar kritiskt bedömt möjligheten till sådan modell och finner att det skulle kunna vara till fördel både från ett etiskt perspektiv såväl som vetenskapligt och vi skulle vilja inkludera följande kombination av stress paradig, delvis baserade på protokoll vi redan föreslagit.

Vi föreslår följande protokoll:

1. **Immobilitet**- möss placeras i en 50 ml plast rör (eller liknande) med öppning på båda sidorna för andning, max 2 h eller två gånger 1 h per dag (beskrivet i åtgärd 7, men kortare);
2. **Porsolt/tvingat simnings test** – max 20 min, 2 gånger per dag (såsom beskrivet i åtgärd 7, men kortare).

Följdfråga: Hur många dagar maximalt under de 21 dagar protokollet pågår?

Svar: Tre. Vi kan föreslå ytterligare en begränsning: Porsolt kan inte heller utföras N gånger i specifika stress kombinationer om inte alla andra stress metoder planerade för detta stress schema också planeras att utföras N gånger (dvs inte mindre).

3. **Lutande bur** – Hemburen lutar 45° under 1 h, en eller två gånger om dagen;
4. **Burbyte** – musen placeras i grannmusens bur (efter att grannmusen förflyttats) under 3 timmar, och placeras sedan tillbaka i sin hembur. En gång per dag.
5. **Fukktigt burspån** – Burspån fuktas med vatten i rumstemperatur, musen får vara kvar i buren med fukttigt span i 3 timmar. En gång per dag.
6. **Inget burspån** – Burspån tas bort från buren under 4 timmar eller två gånger under 2 timmar per dag. Musen placeras i en ren bur med span efter det.
7. **Vattenstress** – Burspån tas bort och tillräckligt med vatten (över rumstemperatur för att undvika hypotermi) för att fylla 0.5cm i botten av buren. Musen tas bort, torkas med en handduk och flyttas till en torr bur. En gång upp till 4 timmar eller två gånger under max 2 timmar.

Det finns andra stress protokoll som beskrivs i relevanta rapporter men vi skulle vilja undvika dom eftersom dom antingen är mycket omständiga och/eller svåra att tekniskt genomföra. Dessa inkluderar:

Tass elchock – två gånger, 5 sek var, 1 mA;

Skakning – grupp om fem möss placeras i en plastbehållare och placeras i en orbital skakare under 1 h at 150 rpm;

Social stress – möss introduceras i en bur med en aggressiv mus och efter att den kuvats placeras i en transparent och perforerad plastbehållare, som gör att ytterligare fysisk kontakt inte kan ske, inne i hemburen under 30 min.

Varmluft – möss exponeras för en varm ström av luft från en hårtork under 10 min.

Vitt buller – möss exponeras för 80 db vitt buller under 2-6 timmar.

Rovdjursljud – Uppspelade av rovdjurs ljud nära buren under 3 timmar.

Sekvenser av stress protokoll varierar mellan rapporter, men alla inkluderar 1 till 2 protokoll per dag, under 5 veckor. Det förekommer också variationer mellan tid för varje stressor (i vissa studier rapporteras 1 timme per stressor, emedan andra 4-6 timmar). I alla rapporterade stress protokoll utförs de i en pseudorandomiserad order.

Vi hoppas att vi kan uppnå effekt genom att applicera olika stress protokoll (list ovan 1 till 7), en per dag under max 21 dagar, antingen löpande eller med upp till två dagars paus.

Vi skulle gärna vilja behålla stress protokollet som beskrivs i åtgärd 7 eftersom detta stressprotokoll har använts i tidigare studier av smärta. Dock inser vi att randomiserade stress protokoll kan leda till bättre resultat med kortare exponering av djuren för stress, men vi måste testa det för att kunna veta om det fungerar.

Följdfråga 34b: Tack för att ni är öppna för nämndens förslag. Vi föreslår att ni använder er av den nya paradigmen (beskriven i svar 34 med variabla stress-stimuli) i första hand, av immobilisering i åtgärd 7 i andra hand, och att Porosolt swim test så som det är beskrivet i åtgärd 7 inte används alls. Kommer ni följa det?

Svar: Ja, vi startar med "shuffled" scheme, om det inte fungerar använder immobilization, men vi vill använda Porsolt swim test ifall de tidigare två andra varianterna inte fungerar. Var god och se detaljerat svar under nästa fråga.

Vi vill också säkerställa att punkt 7, Vattenstress, formuleras som:

- 7. Vattenstress** – Burspånnet tas bort och tillräckligt med vatten (över rumstemperatur för att undvika hypotermi) för att fylla 0.5cm i botten av buren. Mus placeras i denna bur en gång upp till 4 timmar eller två gånger under max 2 timmar per dag. Sedan tas musen bort, torkas med en handduk och flyttas till en torr bur.

Tidigare textvariant kan tolkas på olika sätt.

Följdfråga 34c: Porsolt swimtest är kraftigt ångestframkallande och orsakar inlärld hjälplöshet, något som i bästa fall kan vara relevant gällande antidepressiv medicin för mycket svårt deprimerade. Ert syfte är att framkalla stress så förhoppningsvis är det nya

variationsparadigmet utan att Porsolt swimtest genomförs tillräckligt. Vi föreslår därför att Porsolt utgår helt i samtliga delar av ansökan. Kommer ni följa det?

Svar. Detta är ett klassiskt test och som också är effektivt för att studera stress, dock i kombination med hjälplöshet och vi skulle gärna vilja behålla det men kan minimera hjälplöshetskomponenten. Mot bakgrund av detta skulle vi uppskatta om kommittéen godkänner följande revision: Maximal simmtid – 8 minuter per session (ursprungligen 30), maximalt antal sessioner per dag- 3 (ursprungligen 4 med max tid för varje repeterad session – 20 min). Maximalt utförd under 3 dagar (samma som tidigare). Såsom separat stress paradig används det enbart om “shuffled” strategin eller immobilisering inte leder till förväntat resultat. Såsom del av “shuffled” modellen kan det också endast användas maximalt under tre dagar. Vi föreslår således att sikta på att få resultat från de andra modellerna i första hand.

Vi vill sålunda gärna ha kvar detta med ovan begränsningar ifall de andra modellerna inte ger den väntade effekten. Dock vill vi klargöra att om kommittéen har för avsikt att avslå ansökan i det fall Porsolt inte helt har utgått, så kommer vi förstås att följa förslaget att Porsolt helt utgår i samtliga delar av ansökan.

Följdfråga 34d: Kommer punkterna/stressorerna kombineras och flera utförs samtidigt eller samma dag i variationsparadigmet för pågående stress? Vänligen förtydliga upplägget och verifiera att det endast ska orsaka en mild/måttlig kronisk stress?

Vi utför endast en stressor per dag, maximalt under 21 dagar. Under denna milda/måttliga stress modellen förväntas inte djuren förlora någon vikt. I det fall djuren förlorar 15% eller mer i vikt under försöket klassas stressen som avsevärd och försöket avbryts.

Övriga frågor:

35. Ni använder smärtstillande kräm på svansen på vuxna djur vid AAV injektioner. Varför gör ni inte det på ungar? Vi kan göra det om det inte finns negativ effekt på ungar i samband med smärtstillande kräm. Vi följer alltid vet rekommendationer om de inte hinder oss från att uppnå syfte av experiment.

36. Leverans av ämnen: Ni vill ge ibuprofen 20 mg/kg ip (antar 1 gg/dag). Den rekommenderade dosen i människa är 10 mg/kg (max 4 tabletter per dygn, 200 mg, 75 kg). Varför använder ni en högre dos?

Ibuprofen dos som används för möss varierar i litteratur, vanligtvis ligger i intervall 20-40 mg/kg. Det finns också rapport som visar att hälften effektiv dos i mus är 10 mg/kg och minimal full effektiv dos är runt 20 mg/kg. Det finns också rapport som visar att 50 mg/kg av ibuprofen är inte särskilt effektiv i paraformaldehyde smärta test. Dvs vid sådana olika data kan man hoppas att 20 mg/kg är minimala doser som fungerar i de flesta situationer.

37. Djuren i försöksgrupp 3 verkar genomgå många ingrepp och långvarig smärta (8 mån med artrit eller 3 mån med SNI, detta efter stresstester, kirurgier, administration av substanser och sensoriska tester). Det är många djur som ska ingå i dessa studier (N=1000). Är det möjligt att reducera antalet djur och ändå uppnå statistisk signifikans?

Svar. Enligt gällande regler beskriver vi maximal som händer med djur. Självklart ska inte alla djur som används i försöksgrupp 3 utföras till alla åtgärder. Nämligen estimerar vi att av de 1000 nämnd djur max 300 ska exponeras till både central mekanism åtgärd och ett av två smärta modell, andra 700 ska används för antingen nervskada eller reumatoid artrit modell separat (utan stresstester osv). Dvs 1000 total djur i denna försöksgrupp är rimligt.

Följdfråga 37a: Förstår vi det rätt att i Försöksgrupp 3 kommer djur som ingår i de centrala mekanism-testerna (opioid-tillbakadragande, stress, fysisk aktivitet, sömnbrist) få/utveckla RA/SNI först efter de genomgått de centrala mekanism-testerna?

Svar: det stämmer, "central mekanism" åtgärd kommer alltid innan smärt modell (RA/nervskada) om utförs på samma djur.

Vi har en ytterligare poäng. Vi vill justera texten angående platspreferens test så att försöket klagörs i sin helhet (s. 21, sista paragraf ovan "3. Randall-Selitto Paw Pressure test"). Ny text är i fet stil:

"Samma försök som beskrivet ovan kan komma att utföras användande substanser (se ovan) istället för Ljus. **Habituering utförs på samma sätt som för "ljus" variant av test, dvs max under 5 dagar.** I dessa fall injiceras känselutlösande ämne **eller ämne enligt beskrivning i åtgärd "leverans av ämnen"** (ta bort: enligt ovan) **och mus placeras** i en av de två lådorna en gång per dag (ta bort: i två dagar) **i max sex dagar** och därefter spåras vid senare dagar djurens förflyttning mellan lådorna. I det fall ämnen orsaka obehag kan detta mätas genom att djuret väljer att vistas i den andra lådan där dom inte har fått substans (eller tvärtom). Denna testvariant är måttlig **om injekterande ämne förväntas att orsaka obehag. Denna test är avsevärd om injektion klassas som avsevärd. Annars klassas test som milda (t.ex. om smärtlindrande ämne injiceras). Varje två dagar av injektion räknas som en test (dvs t.ex. en hel test med sex dagar injektion räknas som tre tester). Andra sensoriska tester utförs inte under dagen när "träning" (dvs ämne injektion) utförs. Denna test utförs maximalt en gång per djur. Alla begränsningar av injektion antal gäller.**

Följdfråga 37b: Kan djuren få injektion av ämnen som leder till lidande som klassas som avsevärd svårhet dagligen i 6 dagar och hur länge leder de (totalt sett) till ett avsevärd lidande för djuren?

Svar: Nej, det ska inte hända. Det blir maximalt 3 injektioner av experimentämnerna eftersom vi måste ha lika många gånger av kontrollämnen, dvs 3 + 3. Sannolikheten är låg att vi behöver injicera ämnen som leder till avsevärd svårhet av följande anledning: avsevärt svårighet leder till tydligt svar i djur: t.ex vokalisering, hoppning, immobilitet eller andra starka beteende. Ser vi tecken på sådant beteende drar vi snabb slutsatsen (redan under första tillfälle) att djur upplever smärta och då behöver vi inte utföra så lång test (7 dagar).

Dock vill vi klargöra att vi kan komma att behöva utföra experiment som kan leda till avsevärd svårighet vad gäller ämnen i några situationer, t.ex. i de fall sakkunniga som

bedömer våra resultat anser att det finns tvivel kring beteende resultaten och vill ha tydligare specifika bevis enl ovan. Vi menar att fast beteende som grimas och/eller immobilitet används för att bedöma att djur upplever avsevärd lidande, har vi inte sett att det används med detta syfte (dvs utan andra data) i vetenskapligt litteratur.

Således, vi behöver kunna utföra detta test användande ämnen som leder till avsevärd svårighet och i detta fall blir max total tid av avsevärd lidande $3 * 30 \text{ min} = 1.5 \text{ h}$. (OBS! denna tid motsvarar en formalin test i vår ansökan och mindre än en karragenan test. Både är varianter av Kemisk känslighetstestning)

Följdfråga 37c: Hur länge kan djuren som längst vara i testboxen per dag? Kommer djuren få smärtlindring direkt efter att de tas ur testboxen om injektionen klassats som orsakande av lidande av avsevärd svårhetsgrad?

Svar: max en timme per dag i testbox. Ja, om det finns en klar indikation att djurets lidande är av avsevärd grad ger vi smärtlindring efter att djuret tas från testboxen. I samband med detta behöver vi att höja maximalt antal injektion per dag. Enligt vår ansökan (s. 18, andra raden) får vi ge max en i.p. och s.c. per dag. Nu vill vi ha möjlighet att ge max två s.c. per dag/djur i samband med detta test eftersom båda experimentella ämnena och smärtlindringen kan levereras s.c.

Följdfråga 37d: Vid åtgärden "leverans av ämnen" hur länge riskerar djuren ha smärtpåverkan, endast vid stimultester eller konstant och hur länge? Kommer djuren få smärtlindring direkt efter tester om ämnen injicerats som klassats orsakande av lidande av avsevärd svårhetsgrad?

Hur länge ämnen har effekt beror på olika faktorer, framförallt dos och farmakokinetik (hur snabbt den metaboliseras i kroppen). För att nå bra experimentella resultat försöker vi alltid att justera dos på sådant sätt att djuren upplever en känsla i samband med injektion bara när de sitter i boxen. Upplever djuren en känsla som inte är kopplad till testboxen blir det ingen/minde association mellan känslan och boxen, och då ger inte experimentet något tydligt resultat. Finns det indikation på att djurs lidande motsvarar avsevärd grad ger vi smärtlindring efter att djuren tas från testboxen.

Generell följdfråga: När (vilken tid på dygnet och hur ofta) observeras djuren i Försöksgrupp 1, 2 och 3?

Svar: vanligtvis observeras djuren under normal arbetstid. Enligt L150 observeras alla djur åtminstone en gång per dag. Vanligtvis utförs detta av tekniker. Självklart observeras djur kontinuerligt av forskarna när åtgärd utförs. Efter åtgärd när det finns risk att djur kan bli sämre observeras djur regelbundet under de följande dagar av forskarna men hur ofta och hur många dagar beror på specifik åtgärd. Denna info ges i motsvarande del av åtgärd beskrivning ("Beskrivning av vad som ska göras för att minska djurets lidande..."). Nedan ger vi exempel hur extra tillsyn (oftast av forskare) utförs efter några åtgärder:

Åtgärd 5: Spårningsämne leverans till centrala nervsystem: " För i.sp utförs extra tillsyn en gång varje dag (oftast av en forskare) av åtminstone två följande dagar efter ingrepp."

Åtgärd 6: Centrala mekanismer: opioid tillbakadragande: "Efter testperiod kommer djuren att observeras minst en gång per dag under upp till 4 dagar."

Åtgärd 9: Centrala mekanismer: sömnbrist: "Efter åtgärden utförts examineras djuren en gång per dag under 2 dagar"

Åtgärd 11: Smärta modell: Reumatoid artrit: "Djuren kontrolleras 1-2 timmar efter LPS-injektion för allmänt tillstånd och även tecken på nöd dagligen under 3 dagar. Senare kontrolleras djuren varannan dag tills de tecknen av inflammation i tassar försvinner (ca 3 veckor)"

Stockholms djurförsöksetiska nämnd

10406-2020: Centrala mekanismer i sensoriska nätverk som styr känsel och smärta (PATRIK ERNFORS)

Beredningsgrupp 2 **förslag A** till nämndens ställningstagande.

Syftet med försöken är att identifiera och undersöka de mekanismer som påverkar förmågan att reglera smärtupplevelsen hos däggdjur. Cirka 20% av befolkningen lider av kronisk smärta och ca 1/3 av dessa har svåra smärtor. Ofta saknas adekvata läkemedel för smärtlindring. Sökanden vill använda modeller för kronisk smärta i mus och studera hur dessa påverkas av andra tillstånd så som stress, sömn, ångest, oro, och trauma, för att identifiera de nervbanor och celler som bestämmer hur mycket smärta vi känner. Dessa studier kan leda till att man hittar helt nya mål för läkemedelsutveckling.

Sammantaget anser beredningsgruppen att försökets etiska avvägning är välmotiverad samt kompletterad med frågor och tillfredsställande svar avseende bland annat förtydligande av behov och upplägg av sensoriska tester, närvaro av veterinär, avbrytningspunkter och slutpunkter. Beredningsgruppen anser att den nytta som försöken utgör överlag överstiger det lidande som djuren utsätts för, med undantag för kombinationen av studier på den centrala mekanismen i ett och samma djur.

Försöket enligt ansökan bör

Godkännas med villkor:

1. Ett försök med centrala mekanismer (4.2.1, åtgärd 6, 7, 8, och 9) får inte kombineras i samma djur med ytterligare en åtgärd med centrala mekanismer, så som specificeras i 4.2.1, åtgärd 10. Åtgärd 10 i försöksgrupp 2 får därmed inte utföras.

Giltighetstid bör vara

Fem år från beslutsdatum

Försökets svårhetsgrad bedömer beredningsgruppen som

Avsevärd

Utvärdering i efterhand

Ja, med avseende på:

1. Andel/antal djur som uppnådde avbrytningspunkten
2. Hur stor elstöt som krävdes för att uppnå önskad effekt vid centrala mekanismer, pågående fysisk aktivitet, per stam
3. Huruvida den variabla stressparadigmen ledde till att det vetenskapliga resultat kunde uppnås snabbare eller med färre antal djur

Avgift

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:

15 000 kr

Handläggningstid

Handläggningstiden kommer såvitt beredningsgruppen nu kan bedöma överstiga 40 arbetsdagar.

Ändringar som påverkar den populärvetenskapliga sammanfattningen

Inga

Komplettering (bifogas som bilagor)

Ja, se bilaga avseende frågor och svar.

Undantag

Sökanden söker undantag från kravet på smärtstillande behandling eller avlivning efter ingrepp när ett djur kan uppleva smärta enligt 11 kap. 8 § L 150.

Ange deltagare i beredningsgruppen samt datum för sammanträde

Stina Tucker, Anna Kers Hagberg, Lennart Svensson, Barbara Canlon
beredningsgruppsammanträde 2020-09-18

Reservation

Anna Kers Hagberg

Reservation mot Stockholms djurförsöksetiska nämnds beslut att godkänna ansökan 10406-2020 den 8 oktober 2020

*Ansökan 10406-2020 Centrala mekanismer i sensoriska nätverk som styr känsel och smärta
Sökande Patrik Ernfors, Karolinska institutet*

Ansökan gäller framför allt smärtförsök och omfattar bland annat kronisk smärta i form av nervskada och artritförsök som är bland de mest plågsamma djurförsök som utförs i Sverige i dag och där det inte går att ge smärtlindring. En del djur kommer att ha behandlats innan med ämnen som kan öka smärtekänsligheten. Utöver detta ska djuren utsättas för s.k. centrala mekanismer (CM) och smärtprovokationer som vi bedömer med svårt lidande under lång tid och utan möjlighet till smärtlindring. Djuren får inte heller tillräcklig smärtlindring efter operativa ingrepp. Ansökan som nämnden godkänt innehåller dessutom en stor osäkerhet om påverkan på djuren då CM-åtgärder är något nytt som sökanden vill lägga till utöver de andra smärtförsöken.

Nämnden har godkänt ansökan med villkoret att sökanden får använda CM-åtgärderna men får inte kombinera dem i samma djur. Vi bedömer att det inte räcker för att uppfylla det som lagstiftningen föreskriver för att ett försök ska kunna godkännas då djuren kommer att utsättas för svårt långvarigt lidande som inte går att lindra.

Exempel från försöksgrupp 3 på hur försöket strider mot 7 kap. 9§ djurskyddsförordningen (2019:66), "Ett etiskt godkännande får inte ges för djurförsök som skulle medföra svårt lidande som sannolikt skulle bli långvarigt och inte kunna lindras."

- Djuren kommer att utsättas för centrala mekanismer i kronisk smärta. De kommer att smärtprovoceras i upp till 60 tester varav 10 av avsevärd svårighetsgrad. Ett avsevärt test innebär t.ex. smärta i upp till 58 timmar utan smärtlindring.
- Därefter, kirurgiska ingrepp i t.ex. ryggrad och hjärna och sedan en central mekanism, t.ex. ett variabelt stressparadigm om 21 dagar där djuren utsätts för olika stresstester dagligen, bl.a. upprepade Porsolts swimtest som är av avsevärd svårighetsgrad. Därefter kommer djuren att antingen få artrit eller nervskada.
- Efter det kommer djuren att utsättas för sensoriska/smärtprovocerande tester igen. Så även när de har artrit eller nervskada kan de ha utsatts tidigare av centrala mekanismer. Då har de varit i försök i minst 7 till 8 månader. Med tanke på musens livslängd är det ett långvarigt svårt lidande som inte kan lindras.

Suppleanten Camilla Björkbom (deltagande på mötet men utan rösträtt) påtalade för nämnden att godkännandet av ansökan strider mot djurskyddslagen då sökanden medgivit i svar till fråga 34 c att Porsolt swimtest kan utgå från ansökan. Enligt 7 kap. 1 § första stycket 1-3 djurskyddslagen får djurförsök utföras endast under förutsättning att "verksamheten utformas så att djuren inte utsätts för större lidande än vad som är absolut nödvändigt". I och med att Porsolt swimtest inte anses absolut nödvändigt av sökanden får nämnden inte godkänna Porsolt swimtest, i enlighet med 7 kap. 1 § första stycket 1-3 djurskyddslagen.

Etiska nämndens godkännande av ansökan 10406-2020 strider mot:

- 7 kap. 1 §, punkt 3, djurskyddslagen (2018:1192)
- 7 kap. 9§ djurskyddsförordningen (2019:66)

Anna Kers Hagberg, Eva Eliasson och Mija Jansson Stockholms djurförsöksetiska nämnd avd. 2
2020-10-12