



Jacob Jelsing
c/o Institut for Human Ernæring
Bygning 1-73, lokale M1218, Ridebanevej 12
1870 Frederiksberg C

J.nr.: 2013-15-2934-00784/JANNI
13. marts 2013

Rådet for Dyreforsøg har på sit møde den 27. februar 2013 truffet følgende afgørelse:

Tilladelse

Dyreforsøgstilsynet har givet dig tilladelse til at udføre forsøg med mus, rotter og hamstere i en periode på 5 år, jf. lov om dyreforsøg¹ og lov om kloning og genmodificering af dyr m.v.²

Tilladelsen er givet som beskrevet i din vedlagte ansøgning, herunder 8 C-skemaer med 1 G-skema.

I øvrigt gælder følgende vilkår

I tilfælde af væsentligt påvirket almentilstand eller ved lidelsesvoldende komplikationer skal tilstanden straks afhjælpes, eller dyrene aflives.

Forsøgene må udføres på det angivne forsøgssted, med dertil hørende dyrestalde, som beskrevet i den vedlagte ansøgning

Der skal føres en journal over forsøgene, jf. kap. 4 i bekendtgørelse nr. 88 af 30. januar 2013 om dyreforsøg³. Journalføringen skal ske i et Excel ark eller lignende efter journalbekendtgørelsens bestemmelser.

Du har ansvaret for forsøgenes udførelse, uddannelse og træning af det personale, der er beskæftiget med dyreforsøg eller forsøgsdyrenes pasning, staldes og forsøgslokalers indretning og drift, dyrenes pasning, samt journalføringen, jf. lovens § 3, stk. 4.

¹ Lov om dyreforsøg, jf. lovbekendtgørelse nr. 1306 af 23. november 2007 med senere ændringer

² Lov om kloning og genmodificering af dyr m.v., jf. lov nr. 550 af 24. juni 2005

³ Fødevareministeriets bekendtgørelse nr. 1273 af 12. december 2005 om føring af journal over dyreforsøg samt kloning og genmodificering af dyr

Gebyret for denne tilladelse udgør i alt

5.000 kr. og efterfølgende 1.000 kr. om året

Der vil fra Økonomistyrelsens Service Center (ØSC) blive fremsendt et indbetalingskort, som bedes benyttet ved indbetalingen. Såfremt anden indbetalingsform anvendes, bedes sagsnummer 2013-15-2934-00776 anført.

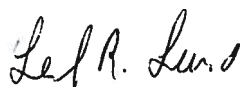
Opkrævning af gebyret sker i henhold til bekendtgørelse om betaling af gebyr for tilladelse til dyreforsøg⁴ og efter § 2, stk. 1, i lov om kloning og genmodificering af dyr m.v., jf. § 15, stk. 1, i lov om dyreforsøg.

Forsøgsdyrsveterinær

Dyreforsøgstilsynet har underrettet den tilsynsførende forsøgsdyrsveterinær om denne tilladelse, jf. § 35 i bekendtgørelse om forsøgsdyrs pasning og opstaldning⁵.

Med venlig hilsen

f. Christian Lundblad



Leif R. Lund

⁴ Fødevareministeriets bekendtgørelse nr. 715 af 1. august 1994 om betaling af gebyr for tilladelse til dyreforsøg

⁵ Fødevareministeriets bekendtgørelse nr. 997 af 16. august 2010 om forsøgsdyrs pasning og opstaldning.

Ny forsøgsdyrstilladelse 2013 - Jacob Jelsing

Status for ansøgning: Godkendt (8. marts 2013)

Den samlede ansøgning indeholder:

Afsnit A

Afsnit B

Oprettede Afsnit C-skemaer:

C 1

C 2

C 3

C 4

C 5

C 6

C 7

C 8

Oprettede Afsnit D-Skemaer:

Oprettede Afsnit E-Skemaer:

Oprettede Afsnit F-Skemaer:

Oprettede Afsnit G-Skemaer:

G 1

Skemaer for onkologiske undersøgelser:

Bilag:

Beskrivelse:

DYREFORSØGSTILSYNET
 Stationsparken 31
 2600 Glostrup
 Telefon: 7227 6900
 E-mail: dyreforsoegstilsynet@fvst.dk
 Hjemmeside: www.dyreforsoegstilsynet.dk

**ANSØGNING OM
 TILLADELSE TIL AT FORETAGE DYREFORSØG
 i medfør af lov om dyreforsøg, jfr. lovbekendtgørelse nr.
 726 af 9. september 1993 som ændret ved lov nr. 1081 af
 20. december 1995**

Ny forsøgsdyrstilladelse 2013

Sag nr.: 2013-15-2934-00784

(udfyldes af Dyreforsøgstilsynet)

Afsnit A: OPLYSNINGER OM ANSØGEREN

Ansøgeren:	Navn	Jacob Jelsing		
	Stilling	Biolog		
Arbejdssted:	Institution/virksomhed	Gubra		
	Adresse	Agern Allé 1		
	Postnummer og By	2970 Hørsholm		
	Telefon	+45 3152 2652	Fax	
	E-mail	jacob@gubra.dk		
Ansøgerens uddannelse:	Art:		Årstal:	
	MSc, Biologi, Naturvidenskabelige Fakultet, København		2002	
	PhD, Sundhedsvidenskabelige Fakultet, København		2006	
Vigtigste tidligere ansættelser og supplerende uddannelser, herunder erfaring med dyreforsøg	August 2002–marts 2006: PhD studerende ved sundhedsvidenskabeligt fakultet, KU. Deltog aktivt i CNS operationer af Göttingen minipigs og Landrace grise. Marts 2006–oktober 2008: Ansat som sektionsleder i Rheoscience med forsøgsdyrsarbejde indenfor rotter og mus. Oktober 2008 CSO Gubra: Egen dyreforsøgstilladelse (2012-15-2934-00079). Ansvarlig for forsøgsdyrsarbejde indenfor rotter, hamstre og mus i firmaets egen dyrestald.			
Deltagelse i kursus i forsøgsdyrkundskab:	<input checked="" type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej	År	Sted	Varighed
		2004	Københavns Universitet	80 timer
Tidligere meddelt tilladelse til dyreforsøg:	<input checked="" type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nej	Seneste dato	J.nr.	
		11. november 2008	2012-15-2934-00079	

Afsnit B: OPLYSNINGER OM FORSØGSSTED

Forsøgssted:	Institution/virksomhed Gubra	
	Adresse Agern Allé 1	
	Postnummer og By 2970 Hørsholm	
	Telefon +45 35283133	Fax
	E-mail jacob@gubra.dk	
Hvor påtænkes dyrene opstaldet ?	Dyrene opstaldes i Gubras egen forsøgsdyrsstald på ovennævnte adresse	
Hvilket personale skal passe dyrene, og hvilken baggrund har dette herfor ? (kontaktperson kan evt. anføres)	Dyrene passes af Gubras egne dyrepassere. Personalet er uddannet iht. § 3 i Justitsministeriets bekendtgørelse nr. 1016 af 12. december 2001 om kvalifikationskrav til personer, der beskæftiger sig med forsøgsdyr.	
Kort beskrivelse af, i hvilket omfang andre deltager i forsøgenes udførelse ?	De eksperimentelle procedurer vil blive udført af de af Gubras eget personale, der har bestået et kursus i forsøgskundskab svarende til kravene i § 2 i Justitsministeriets bekendtgørelse nr. 1016 af 12. december 2001 om kvalifikationskrav til personer, der beskæftiger sig med forsøgsdyr. Alt under ledelse og tilsyn af ansøger.	
Hvilke foranstaltninger er der truffet vedrørende veterinær rådgivning og behandling ?	Dyrene er under tilsyn af Gubras egen dyrlæge, Philip Juul Pedersen, der også yder rådgivning om forsøgsdyrenes velfærd og adfærd jf. kapittel 8 § 35 i Justitsministeriets bekendtgørelse nr. 997 af 16. august 2010 om forsøgsdyrs pasning og opstaldning og om anvendelse af udryddelsestruede og vildtlevende dyr til forsøg mv.	
Dato 8. marts 2013	Ansøgerens underskrift	

Afsnit C-skema nr. C 1

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Kronisk doseringsstudie med ugentlige blodprøver og MRI scanning

A) Det overordnede formål er at undersøge teststoffers effekt på indtagelse af foder og vand, samt teststoffers effekt på kropsvægt og stofskifteskifte i rotter, guldhamstre og mus i forbindelse med mulige lægemiddelkandidater til behandling af overvægt og stofskiftesygdomme som type-2 sukkersyge.

B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers og mulige lægemidlers virkning i en intakt levende organisme. Denne viden fås ved et sammenspil mellem organer og hjerne og kan ikke opnås i en ikke levende model.

B2) Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af lettere karakter.

B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Forsøgene kan være til væsentligt gavn for udviklingen af nye lægemidler til behandling af store folkesygdomme, herunder fedme, type-2 sukkersyge (erhvervet insulin-resistens) samt hjerte-karsygdomme. Der er i de senere år sket en markant stigning i udviklingen af fedme og følgesygdomme heraf. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af livsstilsbetingede sygdomme har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler

D) Forsøgene foregår ved at dyrene (mus, hamstre eller rotter) opstaldes parvis i almindelige bure der opfylder krav om størrelse og miljøberigelse. Eventuel brug af dyr som ikke accepterer artsfæller eller hvor præcise individuelle målinger på foder og vandindtag er påkrævet vil dyrene enkeltopstaldes i hele forsøgsperioden (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Dyrene har fri adgang til almindelig og/eller energirigt foder. Det kan komme på tale at fodre nogle dyr med en mere reduceret fodermængde. Dette kan gøres som semi-faste over en nat, hvor dyrene tilbydes 50% af deres normale fødeindtag eller i en periode op til 4 uger hvor dyrenes foder reduceres (gennemsnitligt op til 40% nedsat kalorieindtag i forsøgsperioden) for at slanke dyrene i forhold til en gruppe der slankes på en stofbehandling. Dyrene kan evt. placeres i et system der konstant monitorerer føde/drikkevandsindtag og motorisk aktivitet elektronisk. Dyrene går her i deres egne kasser, men spiser og drikker evt. via en kanal i burets side, der er tilpasset dyrets størrelse. Farmakologiske teststoffer i udvikling indenfor regulation af kropsvægt og blodglukose gives til dyrene enten enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant under anæstesi og efterfølgende smertelindring, hvorved der frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. Minipumpen frigiver teststoffet subkutant. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt (1-7 dage) eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger. For at vurdere teststoffers fordeling i dyrene kan det være påkrævet at akut injicere et radioaktivt mærket teststof, eks. mærket med kulstof-14 eller calcium-45. Der er tale om indgift af radioaktivitet i ekstremt lave mængder ("spordoser"), som dermed er uden strålebelastning for dyrene, til efterfølgende blodundersøgelser eller billedanalyse .

Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage små blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen (kun haleblod fra mus) uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen.

For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glucosetolerance (dyrenes evne til at optage og deponere sukker). Glucosetolerancen vil blive vurderet ved enten at sprøjte en steril glucose-opløsning ned i maven via en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag). Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver (op til 10 stk) i løbet af maksimalt 5 timer. Mængden af udtaget blod vil være lille og indenfor det anbefalede. Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder.

Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at MRI scanne dyrene op til en gang ugentligt, for at få et generelt mål for kropssammensætning (fordeling af fedt og muskelvæv). Dette vil afsløre om teststoffer har den tilsigtede virkning. Scanningen udføres ved at placere det vågne dyr i en perforeret plasticcylinder, hvor det fikseres skånsomt. Selve scanningen tager op til 1 minut men ofte kortere.

Belastningen på dyrene vurderes at være begrænset til let ubehag og let smerte. Belastningen af opstaldningsforholdene

må betegnes som værende af let karakter. Smertevoldende indgreb som placering af minipumpe foretages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med eventuel enkelttopstaldning, semi-faste, blodprøvetagning, MRI scanning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen.

De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter, hamstre eller mus er enten normale udavlede eller indavlede (ikke genmodificerede). Sidstnævnte repræsenterende dyremodeller for type-2 lignende diabetes og/eller fedme hos mennesker. Udviklingen af mild type 2 diabetes og/eller fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret i rotter og hamstre ved at tilbyde en energirig diæt i op til 12 måneder (her er dyrene altid gruppeopstaldet). Dosering med teststoffer kan være fra dage op til 8 ugers varighed. Teststoffer doseres enten peroralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant via et 1 cm snit der efterfølgende sutureres. Indgrebet foregår under anæstesi og efterfølgende smertelindring. Pumpen frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Eventuel brug af dyr som ikke accepterer artsfæller eller hvor præcise individuelle målinger på foder og vandindtag er påkrævet vil dyrene enkelttopstaldes i hele forsøgsperioden (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 8 uger). Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver en eller flere gange fra halespidsen eller tungevenen (kun haleblod fra mus) uden bedøvelse under hensyntagen til de anbefalede maksimale volumener (<10%). Punktering af tungen foretages med 19-21G kanyle. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen (PK/PD). For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glukose tolerance ved en oral glukose test. Glukose tolerancen vil blive vurderet ved at give en steril glukose-opløsning med en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag) eller fuld fastede i op til 5 timer før sukkerindgift. Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver i op til 5 timer (faste tidspunkter fra en time før sukker gives til 4 timer efter). Belastningen ved disse målinger vil være let til moderat og af kort varighed. Mængden af udtaget blod vil være langt indenfor de acceptable grænser for maksimal blodvolumen der kan udtages (<10%). Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at MRI scanne dyrene op til en gang ugentligt, for at få et mål for kropssammensætning. Dette vil afsløre om teststoffer har en virkning på fedt og muskelmasse. Scanningen udføres ved at placere det vågne dyr i en perforeret plasticylinder, hvor det fikseres skånsomt. Selve scanningen tager op til 1 minut men ofte kortere.

Belastningsgraden:

Ubekvæmhed Let

- beskriv: Foder-induceret og/eller indavlet type-2 diabetes/fedme. Sondedosering. Indlæggelse af osmotisk minipumpe under bedøvelse/smertelindring. Enkelttopstaldning (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 8 uger). Fiksering under MRI scanning. Tørst eller injektion med LiCl i forbindelse med smagsaversionstest.

Lidelse Ingen

- beskriv: Det vurderes at forsøgene ikke vil forårsage nogen form for lidelse, da dyrene enten ikke udsættes for lidelsesvoldende indgreb eller altid vil være tilstrækkeligt smertedækkede.

Smerte Let

- beskriv: Punktering af kar i halespidsen eller tungevene med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: Genetisk betinget eller foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 8 Uger

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte, hamster, mus:

Inhalationsanæstesi: Isofluran/O₂ inhalation (2–4%).

Neuroleptanalgesi: Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte, hamster, mus:

5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage i forbindelse med evt. placering af osmotiske minipumper.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Rotte, hamster, mus: Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed har normal hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til dosering med teststof aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte, hamster, mus:

Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.

Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:

Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipping af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Dyrene passes efter dyrestaldens forskrifter med minimum et dagligt tilsyn og dyrene vejes minimum 1 x ugentlig. Der føres jævnligt veterinært tilsyn med dyrene, ellers efter behov.

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

1000

Hamstre:

250

Mus:

500

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

– begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater og forudses derfor at være vigtig i mange år fremover

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

Afsnit C-skema nr. C 2

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Dosering af teststoffer i hjernens væskehulrum eller relevant hjerneregion

A) overordnede formål er at undersøge teststoffers effekt på indtagelse af foder og vand, samt teststoffers effekt på kropsvægt og sukkerstofskifte i rotter når indgivet direkte i hjernen.

B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme. Denne viden fås ved et sammenspil mellem organer og hjerne og kan ikke opnås i en ikke levende model.

B2) Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af lettere karakter.

B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Forsøgene kan være til væsentligt gavn for udviklingen af nye lægemidler til behandling af store folkesygdomme, herunder fedme, type-2 sukkersyge (erhvervet insulin-resistens) samt hjerte-karsygdomme. Der er i de senere år sket en markant stigning i udviklingen af fedme og følgesygdomme heraf. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af livsstilsbetingede sygdomme har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler.

D) Indlæggelse af kanyler i hjernen gør det muligt at indgive teststoffer direkte og se isoleret på stoffets effekt lokalt. Dette gøres enten ved at indlægge en guide-kanyler ind i et væskefyldt hulrum (ventrikel) i hjernen (dvs. intracerebroventrikulært, ICV), eller direkte ind i en relevant hjerneregion (intracerebralt). Guide-kanylen indsættes i fuld bedøvelse og der opstartes antibiotika behandling og smertestillende behandling. Der laves et lille indsnit oven på dyrets hoved, hvorefter der bores et lille hul i kraniet og kanylen kan nu sættes ned i hjernens væskehulrum eller i den relevante hjerneregion. Dyrets hoved bliver fikseret via en lille metalstang med rund ende sat ind i hver høre-gang (stereotaktisk holder) og kanylen fastgøres med dental-cement til det omgivende knoglevæv. Efterfølgende enkelttopstaldes dyrene og deres adfærd overvåges (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 8 uger). Guide-kanylen kan benyttes til manuel dosering af teststoffer eller tilkobles en eller to osmotiske minipumper, som leverer en fast mængde stof i en periode op til 4 uger. Tilkobles osmotiske minipumper ilægges disse under huden samtidig med at guide-kanylen isættes. Efter isætning af guide-kanyler kan der foretages dosering med teststoffer. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt (1-7 dage) eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 8 uger. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen. Dyrene kan evt. placeres i et system der konstant monitorerer de parametre som udsendes af sensoren samt føde/drikkevandsindtag og motorisk aktivitet elektronisk. Dyrene går i deres egne kasser, men spiser og drikker evt. via en kanal i burets side, der er tilpasset dyrets størrelse. For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glucosetolerance (dyrenes evne til at optage og deponere sukker). Glucosetolerancen vil blive vurderet ved enten at sprøjte en steril glucose-opløsning ned i maven via en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag). Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver (op til 10 stk) i løbet af maksimalt 5 timer. Mængden af udtaget blod vil være lille og indenfor det anbefalede. Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at MRI scanne dyrene op til en gang ugentligt, for at få et generelt mål for kropssammensætning (fordeling af fedt og muskelvæv). Dette vil afsløre om teststoffer har den tilsigtede virkning. Scanningen udføres ved at placere det vågne dyr i en perforeret plasticcylinder, hvor det fikseres skånsomt. Selve scanningen tager op til 1 minut men ofte kortere. Belastningen på dyrene vurderes at være begrænset til let ubehag og let smerte. Smertevoldende indgreb som placering af guide-kanyler og evt minipumpe fortages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med enkelttopstaldning, faste, tørst, blodprøvetagning, MRI scanning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen. De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter er normale udavlede eller indavlede (ikke genmodificerede). Sidstnævnte repræsenterende dyremodeller for type-2 lignende diabetes og/eller fedme hos mennesker. Udviklingen af mild type 2 diabetes og/eller fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret ved at tilbyde en energirig diæt i op til 12 måneder.

Intracerebral injektionskanyle: Rotten ligges i anæstesi og doseres med 0.1 mg/kg atropin, øjensalve, antibiotikaproylaxse (enrofloxacin 10 mg/kg/dag subcutant) samt smertelindrende. Herefter klippes rotten på hovedet og huden desinficeres med chlorhexidin. En 3 cm incision ligges oven på kraniet. Herefter placeres rotten i en stereotaktisk ramme og et hul udbores (0,5 cm i diameter) i kraniet. Herigennem placeres guide-kanyle. Efter guide-kanyle er placeret lukkes kraniet med dental-cement og huden sutureres. Dyrene opstaldes efterfølgende enkeltvis i miljøberigede bure af hensyn til bevarelse af intakte ICV katetre (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). To dages postoperativ smertebehandling. Dyrene tilses dagligt og vejes for at følge deres trivsel. Dosering med teststoffer kan være fra dage op til 8 ugers varighed. Teststoffer doseres enten ICV, peroralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. Behandlingen med teststof foregår typisk over enten 1-7 dage eller 3-5 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halepidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Punktering af tungevene foretages med 19-21G kanyle. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen (PK/PD). For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glukose tolerance ved en oral glukose test. Glukose tolerancen vil blive vurderet ved at give en steril glukose-opløsning med en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag) eller fuld fastede i op til 5 timer før sukkerindgift. Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver i op til 5 timer (faste tidspunkter fra en time før sukker gives til 4 timer efter). Belastningen ved disse målinger vil være let til moderat og af kort varighed. Mængden af udtaget blod vil være langt indenfor de acceptable grænser for maksimal blodvolumen der kan udtages (

Belastningsgraden:

Ubehag Let

- beskriv: Der er let ubehag i forbindelse med injektionerne. Dyrene fastholdes under administrationen af stof via guide-kanyle for at sikre at dyrene ikke kommer til skade hvilket kan opleves stressende for dyret. Dette imødegås med træning og tilvæning til det eksperimentelle paradigme. Foder-induceret og/eller indavlet type-2 diabetes/fedme. Enkeltopstaldning (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). 50% faste. Sondedosering. Fiksering under MRI scanning.

Lidelse Ingen

- beskriv: Det vurderes at forsøgene ikke vil forårsage nogen form for lidelse, da dyrene enten ikke udsættes for lidelsesvoldende indgreb eller altid vil være tilstrækkeligt smertedækkede.

Smerte Let

- beskriv: Guide-kanyle placering og evt. indlæggelse af osmotisk minipumpe under bedøvelse/smertelindring. Evt. punktering af kar i halepidsen eller tungevene med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: Placering af guide-kanyle er permanent. Genetisk betinget eller foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 8 Uger

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte: Inhalationsanæstesi: Isofluran/O2 inhalation (2-4%). Neuroleptanalgesi: Fentanyl 0,21; mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte:
5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Rotte: Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed har normal hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved væggtab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til dosering med teststof aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte:
Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.
Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:
Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipping af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnlige blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydelige smerter trods behandling

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

500

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

- begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater og forudses derfor at være vigtig i mange år fremover. Virksomheden forventes at være kontinuerligt involveret i arbejdet af denne karakter.

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

Afsnit C-skema nr. C 3

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Trådløs monitorering af kropstemperatur, blodtryk og hjertefrekvens samt bevægelses aktivitet

A) Det overordnede formål er at undersøge teststoffers effekt på hjertefunktion (hjertefrekvens, blodtryk), kropstemperatur, indtagelse af føde, vand og motorisk aktivitet, samt teststoffers effekt på sukkerstofskifte i rotter.

B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme. Denne viden fås ved et sammenspil mellem organer og hjerne og kan ikke opnås i en ikke levende model.

B2) Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af lettere karakter.

B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Forsøgene kan være til væsentligt gavn for udviklingen af nye lægemidler til behandling af store folkesygdomme, herunder fedme, type-2 sukkersyge (erhvervet insulin-resistens) samt hjerte-karsygdomme. Der er i de senere år sket en markant stigning i udviklingen af fedme og følgesygdomme heraf. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af livsstilsbetingede sygdomme har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler.

D) Indlæggelse af en telemetriske sensor (måleapparat der trådløst sender data via en radiofrekvens) gør det muligt samtidigt at monitorere teststoffers effekt på hjertefunktion (hjertefrekvens, blodtryk) og kropstemperatur. Sensoren indsættes i fuld bedøvelse og der opstartes antibiotika behandling og smertestillende behandling. Der laves et lille indsnit i bugen og sensoren fæstnes til bugvæggen med to sting. Ønskes det at monitorer hjertefrekvens føres to tynde ledninger under huden til brystkassen. Ønskes det at monitorere blodtryk placeres et lille kateter i et blodkar i bugen. Termometer er indbygget i sensoren. Her efter skal dyrene enkeltopstaldes mens operationssåret heler, men dyrene kan efter ca. en uge gruppeopstaldes, hvis de ikke direkte indgår i telemetriske forsøg. I den post-operative fase behandles dyrene med smertelindrende morfika samt med profylaktisk anti-inflammatorisk og antibiotika i 3 dage. Ved telemetriske forsøg placeres dyrene enkeltvis i et system der konstant monitorerer de parametre som udsendes af sensoren samt føde/drikkevandsindtag og motorisk aktivitet elektronisk (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 12 uger). Dyrene går i deres egne kasser, men spiser og drikker evt. via en kanal i burets side, der er tilpasset dyrets størrelse. Dyrene kan her monitoreres over længere tid (op til 12 uger) og tilbydes enten normal eller kalorierig diæt (overvægtige rotter) således de kan træffe et valg. Efter isætning af den telemetriske sensor kan der foretages dosering med teststoffer. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt (1-7 dage) eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 12 uger. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). I specielle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant under anæstesi og efterfølgende smertelindring, hvorved der frigives teststof kontinuerligt i optil 4 uger. Minipumpen frigiver teststoffet subkutant. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen.

For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glucosetolerance (dyrenes evne til at optage og deponere sukker). Glucosetolerancen vil blive vurderet ved enten at sprøjte en steril glucose-opløsning ned i maven via en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag). Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver (op til 10 stk) i løbet af maksimalt 5 timer. Mængden af udtaget blod vil være lille og indenfor det anbefalede. Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder.

Der ansøges om tilladelse til at beholde dyr i op til 12 måneder (forventet batteri-levetid for telemetriske sensorer) efter isætning af sensorer under hensyntagen til de humane endepunkter beskrevet andetsteds. Belastningen på dyrene vurderes at være begrænset til let ubehag og let smerte. Smertevoldende indgreb som placering af telemetriske sensorer og evt minipumpe foretages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med enkeltopstaldning, faste, blodprøvetagning, MRI scanning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen. De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter er enten normale udavlede eller indavlede (ikke genmodificerede). Sidstnævnte repræsenterende dyremodeller for type-2 lignende diabetes og/eller fedme hos mennesker. Udviklingen af mild type 2 diabetes og/eller fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret ved at tilbyde en energirig diæt i op til 12 måneder. Isætning af telemetriske sensorer: Rotten ligges i anæstesi og doseres med 0.1 mg/kg atropine, øjensalve, antibiotikaproylaxse (enrofloxacin 10 mg/kg/dag subcutant) samt smertelindrende. Herefter klippes rotten og huden desinficeres med chlorhexidin. En 5 cm incision ligges i linea alba. Ønskes det at monitorere blodtryk blotlægges den venstre illiolumbare forgrening af aorta og trykkateteret placeres i denne. Skal der monitoreres hjertefrekvens føres de to sensorer subcutant til brystkassen. Sensoren fæstnes med to suturer til den højre bugvæg og operationssåret lukkes. Dyrene opstaldes efterfølgende enkeltvis i miljøberigede bure i en uge medens operationssåret heler. To dages postoperativ smertebehandling. Dyrene tilses dagligt og vejes for at følge deres trivsel. Ved telemetrieforsøg opstaldes dyrene enkeltvis (typisk kortvarigt 1–7 dage eller over 2–4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 12 uger). Samtidig dosering med teststoffer kan være fra dage op til 12 ugers varighed. Teststoffer doseres enten peroralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant via et 1 cm snit der efterfølgende sutureres. Indgrebet foregår under anæstesi og efterfølgende smertelindring. Pumpen frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Punktering af tungevene foretages med 19–21G kanyle. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen (PK/PD). For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glukose tolerance ved en oral glukose test. Glukose tolerancen vil blive vurderet ved at give en steril glukose-opløsning med en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag) eller fuld fastede i op til 5 timer før sukkerindgift. Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver i op til 5 timer (faste tidspunkter fra en time før sukker gives til 4 timer efter). Belastningen ved disse målinger vil være let til moderat og af kort varighed. Mængden af udtaget blod vil være langt indenfor de acceptable grænser for maksimal blodvolumen der kan udtages (<10%). Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder.

Belastningsgraden:

Ubehag Let

– beskriv: Foder-induceret og/eller indavlet type-2 diabetes/fedme. Sondedosering. Enkeltopstaldning (typisk kortvarigt 1–7 dage eller over 2–4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde være i op til 12 uger). Evt. 50% faste. Fiksering under MRI scanning.

Lidelse Ingen

– beskriv: Det vurderes at forsøgene ikke vil forårsage nogen form for lidelse, da dyrene enten ikke udsættes for lidelsesvoldende indgreb eller altid vil være tilstrækkeligt smertedækkede.

Smerte Let

– beskriv: Sensorplacering og evt. indlæggelse af osmotisk minipumpe under bedøvelse/smertelindring. Evt. punktering af kar i halespidsen eller tungevene med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv: Placering af telemetriske sensorer er permanent. Genetisk betinget eller foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 12 Måneder

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte:
Inhalationsanæstesi: Isofluran/O2 inhalation (2–4%).

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte:
5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage.
5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage i forbindelse med evt. placering af osmotiske minipumper.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Rotte: Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed har normal hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til dosering med teststof aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte:
Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.
Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:
Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21 mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipping af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnligt blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydende smerter trods behandling

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

50

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

– begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater og forudses derfor at være vigtig i mange år fremover. Virksomheden forventes at være kontinuerligt involveret i arbejde af denne karakter.

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

Afsnit C-skema nr. C 4

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Glukose clamp i rotter

A) Det overordnede formål er at studere og kontrollere forandringer i blodsukker (glukose)-niveauet, ved enten at etablere et lavt, normalt eller forhøjet blodsukker-niveau i rotter. Herved kan teststoffers effekt på insulin følsomhed undersøges kvantitativt i rotter, give et mål for hvor godt dyret omsætter glukose, og hvor stor en følsomhed det har for insulin. Samtidig er der mulighed for at teste behandlinger mod akut livstruende nedsat blodsukker og anvende mekaniske glukose-sensorer til bestemmelse af glukoseniveauer i modellen.

B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme. Omsætningen af blodsukker, insulin-sekretion og insulin følsomhed er et resultat af et sammenspil mellem mange organer og hjernen, og denne viden kan ikke opnås i en ikke-levende model eller simuleres.

B2) Glukose clamp betragtes som den bedste test af blodsukker-omsætning, insulin-sekretion og insulin følsomhed i både mennesker og dyr og benyttes derfor hyppigt. Der er ingen alternative eller mindre belastende protokoller eller behandlinger, som ville kunne bruges til at beskrive insulinfølsomhed. Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af lettere karakter.

B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Forsøg med hyperinsulinemisk euglykemisk clamp (bevarelse af normalt blodsukker under indgift af insulin) kan være til væsentligt gavn for udviklingen af nye lægemidler til behandling af store folkesygdomme, herunder fedme, type-2 sukkersyge (erhvervet insulin-resistens) samt hjerte-karsygdomme. Der er i de senere år sket en markant stigning i udviklingen af fedme og følgesygdomme heraf. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af livsstilsbetingede sygdomme har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler. Desuden kan der anvendes hypoglykemisk clamp (konstant sænket blodsukker), som vil gøre det muligt at teste såkaldte retnings-kits til akut insulin-induceret livstruende lavt blodsukker hos type 1 diabetikere. Sluttelig kan der også anvendes hyperglykemisk clamp (konstant forhøjet blodsukker) som giver mulighed for at teste nyudviklede bærbare glukose-sensorer og insulinpumper, som i dag udleveres til alle type 1 diabetiske børn og gravide. Disse sensorer er blevet så små (< 5*5*1 cm og

D) Dyrene opstaldes i bure der opfylder krav om størrelse og miljøberigelse. Forud for hyperinsulinemisk normoglykemisk clamp forsøg kan der foretages dosering med teststoffer for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på glukoseomsætning, insulin-sekretion og insulin følsomhed i rotten. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt (1-7 dage) eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger. Teststoffer doseres enten gennem munden med en sonde, under huden, i muskellvæv, i blodbanen eller i bughulen. I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant under anæstesi og efterfølgende smertelindring, hvorved der frigives teststof kontinuerligt i optil 4 uger. Minipumpen frigiver teststoffet subkutant. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Under dette behandlingsforløb kan det være nødvendigt at udtage mindre blodprøver fra halespidsen eller tungevenen på vågne dyr, som anvendes til måling af relevante analytter, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen. Glukose clamp laves på vågne rotter. Ved hjælp af denne metode er det muligt at regulere blodsukker-koncentrationen og ydermere kvantitativt bestemme insulinfølsomheden i rotter. Insulinfølsomheden bestemmes ved den glukose-infusionsrate der kræves under konstant insulin-infusion for at opretholde blodsukker-niveauet i normalområdet (ca. 5 mmol/L). En uge inden clampen gennemgår rotten en mindre operation under fuld bedøvelse, hvor der indlægges kateter i vena jugularis og arterie carotis på halsen, og den åbne ende af kateteret føres ud gennem nakkehuden. Her efter skal dyrene enkeltopstaldes for at bevare katetrene intakte (dette kan have en varighed op til 4 uger, som typisk er den længste periode et kateter kan forventes at fungere). I den post-operative fase behandles dyrene med smertelindrende morfika samt med profylaktisk anti-inflammatorisk og antibiotika i 3 dage. Da operationen i sig selv giver insulin-resistens er det nødvendigt med en rekonvalescens-periode på mindst 7 dage. Herefter kan rotten indgå i glukose clamp forsøg. Clampen tager 1-10 timer afhængig af de individuelle eksperimenters karakter. Under clampen gives glukose gennem det venøse kateter der tilkobles en infusionspumpe og der udtages blodprøver fra det arterielle kateter med faste intervaller (typisk 50 µl mellem hvert 6. til 20. minut) til måling af blodsukker og plasma insulin. Selve blodprøvetagningen udføres automatisk af en robot. Således kan meget små blodvolumener udtages med minimalt spild. Ved længerevarende eller gentagne clamps gives dog donerblod for at undgå blodmangel. Tilkoblingen mellem rotte og robot sker ved, at rotten får monteret en lille vest bestående af tynde gymmislinger. Til vesten fæstnes en tynd fjeder som beskytter katetrene. Denne føres lodret op til en balancearm, som udligner vægten af fjederen, således rotten ikke tynghes af denne og kan bevæge sig frit. Blodsukkeret måles løbende således glukose-infusionsraten kan reguleres under forsøget. For at vurdere teststoffers fordeling i dyrene kan det være påkrævet at akut injicere et radioaktivt

mærket glukose, eks. mærket med kulstof-14. Der er tale om indgift af radioaktivitet i ekstremt lave mængder ("spordoser"), som dermed er uden strålebelastning for dyrene, til efterfølgende blodundersøgelser eller billedanalyse. I tilfælde af at man undersøger et teststofs effekt på akut insulin-induceret lavt blodsukker benyttes hypoglykemisk clamp og teststoffet gives akut under clampen. Clampforsøg kan endvidere udnyttes til test af nyudviklede bærbare glukose-sensorer og insulinpumper. Her benyttes hyperglykemisk clamp, hvor blodglukosen forhøjes ved hjælp af venøs glukose infusion uden brug af insulin. En til to sensorer placeres under huden med en lille nål under kortvarig bedøvelse og efterfølgende smertelindring og senderne placeres på huden med et stykke klister og nogle få hudsuturer i en periode på maks 7 dage, hvorefter den fjernes. Herved fås mange målinger af blodsukkeret uden at dyrets normale funktioner påvirkes. Redegørelse for den på dyrene påførte belastning: Belastningen på dyrene vurderes at være begrænset til let ubehag og let smerte. Alle smertevoldende indgreb fortages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med efterfølgende enkelttopstaldning, faste, montering af jakke og evt glukosesensor, blodprøvetagning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen og hele tiden lade dyrene kunne bevæge sig frit. De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes.

De anvendte rotter er enten normale udavlede (f.eks. SpragueDawley) eller indavlede (ikke genmodificerede, f.eks. Zucker obese), sidstnævnte repræsenterende dyremodeller for type-2 lignende diabetes og/eller fedme hos mennesker. Udviklingen af mild type 2 diabetes og/eller fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret ved at tilbyde en energirig diæt i op til 12 måneder.

Forud for hyperinsulinemisk normoglykemisk clamp forsøg kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 8 uger) for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på glukoseomsætning, insulin-sekretion og insulin følsomhed i rotnen. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant via et 1 cm snit der efterfølgende sutureres. Indgrebet foregår under anæstesi og efterfølgende smertelindring. Pumpen frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. En ny Pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof.

Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen (PK/PD). I nogle forsøg kan det blive nødvendigt at indsætte en til to glukosesensorer under huden. Sensorerne placeres under huden med en lille nål under kortvarig anæstesi og efterfølgende smertelindring og senderne placeres på huden med et stykke klister og nogle få hudsuturer i en periode på maks 7 dage, hvor dyret enkelttopstaldes, hvorefter den fjernes.

Forud for glukose clamp skal rotnen gennemgå en mindre operation, hvor to permanente katetre placeres i henholdsvis jugularvenen og arterie carotis. Rotten ligges i anæstesi og doseres med 0.1 mg/kg atropine, øjensalve, antibiotikaproylaxse (enrofloxacin 10 mg/kg/dag subcutant) samt smertelindrende. Herefter klippes rotnen og huden desinficeres med chlorhexidin. En 3 cm incision ligges i midtlinjen på undersiden af halsen hvor igennem begge kar blotligges og katetrene indføres. Katatrene føres ud gennem en 1 cm incision i nakken med et trokar og begge incisioner lukkes med sutur. Dyrene opstaldes efterfølgende enkeltvis i miljøberigede bure af hensyn til bevarelse af intakte katetre (op til 4 uger). Postoperativ restitution i minimum 7 dage incl. 2 dages postoperativ smertebehandling. Dyrene tilses dagligt og vejes for at følge deres trivsel.

Clampforsøg kan udføres i fastede (max 18 timer) og ikke-fastede dyr (varighed op til 10 timer). Rotterne er vågne og ikke-fikserede med adgang til drikkevand. Forsøget omfatter i korte træk en kontinuert intravenøs infusion af insulin under samtidig måling af blodsukkeret med korte intervaller, som vedligeholdes på et på forhånd fastlagt niveau ved at justere på en intravenøs infusion af en glukose. Glukoseinfusionsraten er mål for rottens insulinfølsomhed og/eller styrken af den infunderede insulin. Der vil i nogle tilfælde indgives radioaktivt mærket glukose/insulin, der i så tilfælde kan anvendes til detaljeret måling af glukose/insulin metabolismen. Til hyperglykemisk clamp benyttes ikke insulin. Under clampen gives glukose gennem det venøse kateter der tilkobles en infusionspumpe og der udtages blodprøver fra det arterielle kateter med faste intervaller til måling af blodsukker og plasma insulin. Selve blodprøvetagningen udføres automatisk af en robot. Således kan meget små blodvolumener udtages med minimalt spild. Ved længerevarende eller gentagne clamps (maks 4 pr uge) gives dog donerblod for at undgå blodmangel. Der tages aldrig mere end 10% af blodvolumen pr clamp. Der gives altid væske og tages mere end 5% blodvolumen ved gentagne clamps gives der altid blodtransfusion (2 ml EDTA stabilized blood with reduced plasma). Tilkoblingen mellem rotte og robot sker ved, at rotnen får monteret en lille vest bestående af tynde gymmislanger. Til vesten fæstnes en tynd fjeder som beskytter katetrene. Denne føres lodret op til en balancearm, som udligner vægten af fjederen, således rotnen ikke tynges af denne og kan bevæge sig frit. Blodsukkeret måles på en Biosen glucose analyser og registreres løbende således glukose infusionsraten kan reguleres under forsøget.

Belastningsgraden:

Ubehag Let

- beskriv: Foder-induceret og/eller indavlet type-2 diabetes/fedme. Sondedosering. Indlæggelse af osmotisk minipumpe og/eller sukkersensor under bedøvelse/smertelindring. Indlæggelse af kroniske katetre under bedøvelse/smertelindring. Enkeltopstaldning under restitution og clampforsøg op til 4 uger. Rotten er dog ikke fikseret.

Lidelse Ingen

- beskriv: Begrænses eller undgås i videst muligt omfang da vantrivsel (lidelse) i forbindelse med målinger af sukkerstofskiftet ikke er foreneligt med pålidelige forsøgsresultater.

Smerte Let

- beskriv: Punktering af kar i halespidsen eller tungevenen med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: Genetisk betinget eller foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 8 Uger

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej**Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:**

Rotte:

Inhalationsanæstesi: Isofluran/O2 inhalation (2-4%).

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte:

5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage i forbindelse med placering af osmotiske minipumper. 0.05 mg/Kg buprenorphine (Vetergesic) SC BID gives på dagen for kateteroperation. 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives de efterfølgende 2 dage.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed retter sig efter operationen med fokus på hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang 7 dage efter operation. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til operationen aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte:

Overdosis pentobarbital eller CO2/O2 inhalation.

Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:

Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21 mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipning af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnlige blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydende smerter trods behandling

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

400

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

– begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater og glukosesensorer og forudses derfor at være vigtig i mange år fremover. Virksomheden forventes at være kontinuerligt involveret i arbejde af denne karakter

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

C 4

Afsnit C-skema nr. C 5

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Selektiv deafferentiering af vagus nerven (SDA) A) Det overordnede formål med denne type forsøg er at tilegne sig viden om hvorvidt teststoffers virkningsmekanisme er medieret via vagus nerven og hermed hvorvidt teststoffer virkningsveje er centralt eller perifert medieret. B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme. Denne viden fås ved et sammenspil mellem organer og hjerne og kan ikke opnås i en ikke levende model. B2) Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af moderat karakter. B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Forsøgene kan være til væsentlig gavn for udviklingen af nye lægemidler til behandling af store folkesygdomme, herunder fedme, type-2 sukkersyge (erhvervet insulin-resistens) samt hjerte-karsygdomme. Der er i de senere år sket en markant stigning i udviklingen af fedme og følgesygdomme heraf. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af livsstilsbetingede sygdomme har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler. D) Der gives væskebehandling umiddelbart inden og efter operationen. Der opstartes antibiotika og smertestillende behandling. Selve operationen foregår under fuld bedøvelse. Forsøget inkluderer to kirurgiske indgreb. Alle indgreb foregår i fuldt bedøvede og fikserede dyr. Først bores der et lille hul i den bagerste del af kraniet over hjernestammen. Hjernehindnen brydes og de afferente (sensoriske) og efferente (motoriske) vagus nerver (den tiende hjernenerve) blotlægges på det niveau, hvor de hæfter sig til hjernestammen. I venstre side overlippes forsigtigt de sensoriske nerver. De motoriske nerver efterlades urørte. Indgrebet forårsager ingen blødning. Kraniet lukkes med skum og huden sutureres. Efterfølgende udføres en subdiaphragmatisk vagotomi af den dorsale (højre) vagus nerve. Der laves et snit i den forreste del af bugen. Mave og spiserør løftes forsigtigt op hvorved den dorsale vagus nerve blotlægges og overlippes. Hud- og muskellag sutureres. Belastningen af indgrebet vil være moderat og relatere sig til operationen og dagene herefter, hvorefter dyrene vil være i fin trivsel. Placebo-operation (sham): Det vil være nødvendigt at operere en gruppe dyr som kontrolgruppe for selektiv vagal deafferentierede (SDA) opererede dyr. Her vil SDA operationen blive udført uden at nogen nerveforbindelser brydes, men ellers helt på samme måde.

Efter SDA/SHAM operation skal dyrene enkeltopstaldes medens operationssårene heler og da disse dyr typisk indgår direkte i teststofforsøg, vil enkeltopstaldningen typisk bibeholdes (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Efter SDA operation kan der foretages dosering med teststoffer. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt (1-7 dage) eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskeltvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intrapitonealt). Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen. Dyrene kan evt. placeres i et system der konstant monitorerer de parametre som udsendes af sensoren samt føde/drikkevandsindtag og motorisk aktivitet elektronisk. Dyrene går i deres egne kasser, men spiser og drikker evt. via en kanal i burets side. Belastningen på dyrene vurderes at være begrænset til moderat ubehag og let smerte. Samlet set fjerner proceduren alle sensoriske (afferente) nerver hidrørende fra vagus nerven til mavetarmkanalen (mavesæk, tarm). Den motorisk innervation (de efferente fibre) bevares. Den beskrevne procedure er således af langt mindre belastning for dyrene postoperativt i forhold til den oftest anvendte totale subdiaphragmatiske vagotomi hvor både den dorsale og ventrale vagus nerve overlippes. Disse operationer fører til komplet postoperativ parese (muskelaflapning) af tarmen der ofte er langvarig og kan besværliggøre fordøjelsen. Smertevoldende indgreb som SDA operation og evt. ilæggelse af minipumpe foretages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med enkeltopstaldning, blodprøvetagning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen. De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter er normale udavlede.

SDA: Rotten ligges i anæstesi og doseres med 0.1 mg/kg atropin, øjensalve, antibiotikaproylaxse (enrofloxacin 10 mg/kg/dag subcutant) samt smertelindrende. Herefter klippes rotten under halsen på maven og huden desinficeres med chlorhexidin. En 3 cm incision ligges under halsen og der disikeres stumpet til basis af kraniet. Under mikroskop bores et lille hul i kraniet ved foramen lacerum posteriores. Herved blottes hjernehinderne (dura) og hjernestammen. Dura gennembrydes og de dorsale rødder af venstre nervus vagus kan nu ses og de afferente nervefibre brydes med en pincet uden at forårsage skade på de efferente fibre. Hullet i kraniet lukkes med Spongostan og såret sutureres. Herefter udføres en subdiaphragmatisk vagatomi af den dorsale vagus, hvorved vagus nervens afferente og efferente fibre brydes. Dette gøres via en 5 cm incision i linea alba, hvor mavesækken og spiserøret efterfølgende flyttes til siden. Herved kan den dorsale vagus ses og frigøres fra spiserøret. Oralt for rami coeliaci nervi vagi brydes vagus totalt. Til sidst foretages lagvis lukning og der gives væske subcutant. Der gives 2 dages postoperativ smertebehandling samt antibiotika. Dyrene tilses dagligt og vejes for at følge deres trivsel. Placebo-operation (sham): Det vil være nødvendigt at operere en gruppe dyr som kontrolgruppe for SDA opererede dyr. Her vil SDA operationen blive udført uden at nogen nerveforbindelser brydes, men ellers helt på samme måde. Efter SDA/SHAM operation skal dyrene enkelttopstaldes medens operationssårene heler og da disse dyr typisk indgår direkte i teststofforsøg, vil enkelttopstaldningen typisk bibeholdes (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Efter SDA operation kan der foretages dosering med teststoffer. Dosering med teststoffer kan være fra dage op til 8 ugers varighed. Teststoffer doseres enten peroralt, subcutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. Efter SDA operation kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Punktering af tungevene foretages med 19-21G kanyler. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen (PK/PD).

Belastningsgraden:

Ubehag Let

- beskriv: Enkelttopstaldning (typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Evt. sondedosering.

Lidelse Ingen

- beskriv: Det vurderes at forsøgene ikke vil forårsage nogen form for lidelse, da dyrene enten ikke udsættes for lidelsesvoldende indgreb eller altid vil være tilstrækkeligt smertedækkede.

Smerte Let

- beskriv: Evt. punktering af kar i halespidsen eller tungevene med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: SDA er permanent.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 8 Uger

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte:
Neuroleptanalgesi: Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte:
5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD gives 3 dage.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Rotte: Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed har normal hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til dosering med teststof aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte:
Overdosis pentobarbital eller CO2/O2 inhalation.
Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:
Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet aflødning ved opklipping af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnligt blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydende smerter trods behandling

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

200

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

– begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater og forudses derfor at være vigtig i mange år fremover. Virksomheden forventes at være kontinuerligt involveret i arbejde af denne karakter.

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

Afsnit C-skema nr. C 6

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Dyremodel for Parkinsons sygdom. A) Det overordnede formål er evaluere teststoffers effekter i dyremodel for Parkinson's sygdom (PD). PD er en neurodegenerativ sygdom der forekommer over hele verden og rammer alle etniske grupper. Sygdommen debuterer typisk i 65-års alderen og rammer primært det dopaminerge system i hjernen. Sygdommen kan i dag behandles, men ikke helbredes. Formålet med forsøget er at undersøge det funktionelle samspil mellem forskellige områder af centralnervesystemet (CNS) og mellem CNS og perifere organer/væv ved hjælp af en neurokemisk læsion i det dopaminerge system i rotter samt at undersøge om nye lægemidler kan afhjælpe neurontabet man ser hos PD patienter. B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme, da både adfærd og mange fysiologiske hændelser styres af et komplekst samspil af biologiske og kemiske processer, som ikke kan genskabes i reagensglasforsøg. Omsætningen af teststoffets virkning på hjernen samt samspillet med andre organer er en viden kan ikke opnås i en ikke-levende model eller simuleres. B2) In vivo forsøg er afgørende for eventuelle motoriske forbedringer der ville kunne translateres direkte til humane neurodegenerative sygdomme. B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser og der anvendes maksimalt 200 rotter per år.

C). PD forekommer over hele verden og rammer alle etniske grupper. Sygdommen er lige hyppig hos de to køn eller med en mindre overvægt af mænd. Imellem 5.000 og 6.000 mennesker i Danmark har sygdommen, men mange flere er som pårørende ramt af den. Sygdommen debuterer typisk i 65-års alderen. Dog rammes ca. 5-10% før 40-års alderen. Sygdomsforekomsten stiger med stigende alder. Symptomerne varierer meget fra person til person og er afhængige af, hvor længe man har haft sygdommen. Hovedsymptomerne er hvile-tremor/rysten også kaldet pille-trille tremor (der dog ikke er til stede under søvn), muskelstivhed, langsomme træge bevægelser og/eller balancebesvær. Patienter kan også få andre problemer såsom træthed, depression og besvær med at skrive. Nogle har tillige problemer med at spise, samt synkebesvær. Symptomerne skyldes for en væsentlig del nedsat produktion af transmitterstoffet dopamin i substantia nigra (bredt bånd af dopamin-producerende nerveceller) i midthjernen. Substantia nigra fungerer som en relæ-kerne, der kontrollerer koordineringen af uvilkårlige muskelbevægelser og er særlig vigtig for initieringen af bevægelser (starter funktion). Hos patienter med PD er en stor del af de dopaminerge nervecellerne i substantia nigra forsvundet. Tabet af disse celler resulterer i langt mindre kommunikation imellem de forskellige dele af hjernen, hvorfor det ikke længere er muligt for patienter med Parkinsons sygdom at kontrollere deres bevægelser på normal vis. Sygdommen kan i dag behandles, men ikke helbredes. Den medicinske behandling er en substitutionsterapi med det manglende dopamin i form af L-dopa. Denne behandling kan i væsentlig grad mindske symptomerne, men har også mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler, der eventuelt ville kunne bremse den neurodegeneration der sker i det dopaminerge system. Den læsionsmodel vi har valgt at arbejde med er almen og velbeskrevet og er endvidere anvendelig til at undersøge de cellulære og molekylære forandringer, som sker i forbindelse med ødelæggelsen af de dopaminerge nerveceller. Dette er væsentligt for at forstå eventuelle nye lægemidlers virkningsmekanisme(r).

D) Dyrene opstaldes i bure der opfylder krav om størrelse og miljøberigelse. Forud for adfærdsforsøgene kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 3 måneder) for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på indlæring over tid. Teststoffer doseres enten gennem munden med en sonde, under huden, i muskeltvæv eller i blodbanen. Det generelle forløb som rotterne vil blive udsat for er som følger: En nerveskade påføres under fuld bedøvelse. Pelsen imellem ørerne på dyrets hoved barberes af, hvorefter dyrets hoved fikseres i et stereotaksis apparat. Herefter laves et snit på ca. 5 mm med en skapel for at eksponere kraniet, og der bores et hul i venstre side af hjerneskallen, hvorigennem neurotoksinet (typisk 6-OHDA-HCl) injiceres op til flere steder i midthjernen. Bindevævet fra området genplaceres herefter henover læsionen, og huden sys sammen med 2-3 sting. Indgrebet tager cirka 20 minutter. Inden dyret vågner op fra bedøvelsen, indgives et smertestillende stof. Denne smertestillende behandling fortsætter i dagene efter indgrebet, indtil såret er vokset sammen. Dyrene enkeltopstaldes i 5 dage medens operationsåret heler, og kan herefter atter grupperopstaldes.

Den injicerede neurotoksin vil påføre en læsion i det injiceret område hvor der vil forekomme en langvarig (over flere uger) retrograd nedbrydning af de tilsvarende dopaminerge nerveceller i substantia nigra pars compacta (SNc), hvilket resulterer i udvikling af PDs karakteristiske neurologiske motoriske symptomer, såsom langsomme træge bevægelser, rysten og muskelstivhed, i dyrets ene side. De PD-lignende symptomer påvirker dog ikke dyrets almene bevægelsesfrihed, men kan evalueres, ved at udsætte dyret for en såkaldt rotations-adfærdstest. Ved at teste dyrets motoriske evne i denne test er det muligt at måle dyrets motoriske færdigheder, og dermed om behandlingen med et teststof har en beskyttende effekt under udviklingen af PD.

Motoriske analyser: Man kan vurdere effekten af teststoffer på motorisk funktion såsom balanceevne og aktivitetsniveau. Disse målinger kan foretages ved at undersøge dyrets evne til at balancere på en roterende pind (rotarod) eller målinger af

dyrets aktivitetsniveau via fotoceller monteret i dyrets eget bur eller et testbur. Dyret kan endvidere filmes under testen og filmen efterfølgende analyseres. De kraftigste belastninger af dyret anses derfor at være behandling med teststof og med aktivitetsfremmende eller aktivitets hæmmende stoffer. Rotations- adfærdstest: da nerveskaden kun er udført på den ene hjernehalvdel, er der en ubalance i den motoriske aktivitet, hvilket ofte vil give sig til udtryk i, at dyret spontant vil rotere sig mod læsionssiden. Ved at administrere en indirekte dopamin agonist (dvs. et stof, der normalt frigives af dopamin, her D-amfetamin eller apomorfín) vil det øge den motoriske ubalance. Rotationsmønsteret efter indgift af D-amfetamin eller apomorfín vil derfor forstærkes og være proportionalt med sværhedsgraden af læsionen. Antallet af rotationer bestemmes i et automatiseret rotations system (en gennemsigtig plastik cylinder med en diameter på 30x30 cm) hvor antallet af rotationer automatisk registreres. Dyret får en sele omkring livet der er forbundet med et tællesystem. Testen tager maksimalt 30 min. Dyr, der testes i et testsystem, kan godt testes efterfølgende i et andet forudsat at der er minimum 14 dages pause ('wash-out') imellem to uafhængige tests (se nedenfor). Et dyr vil ikke blive udsat for mere end maksimalt 4 adfærdstest. Rotations- adfærdstesten kan udføres flere gange (op til 6 gange) efter pådragelsen af nerveskaden. Redegørelse for den på dyrene påførte belastning: Ingen af de ovennævnte adfærds- og motoriske forsøg vil være til videre gene for dyret. Der forventes en forbipasserende ubehag i forbindelse med stof- induceret rotationer. Efter 4 timer forventes stofpåvirkingen dog at være forsvundet. Alle kirurgiske indgreb foretages under fuld bedøvelse og med efterfølgende og tilstrækkelig smertebehandling. Det additive ubehag i forbindelse med efterfølgende enkelttopstaldning, samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen og hele tiden lade dyrene kunne bevæge sig frit. De beskrevne indgreb og tests er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene og test være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter er normale udavlede (f.eks. Sprague-Dawley rotter). Udviklingen af fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret ved at tilbyde en energirig diæt i op til 12 måneder. Forud for adfærdsforsøg kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 3 måneder) for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på motoriske færdigheder. Teststoffer doseres enten peroralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. I sjældne tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe der placeres subkutant under anæstesi og efterfølgende smertelindring, hvorved der frigives teststof kontinuert. Minipumpen frigiver teststoffet subkutant, men kan også tilsluttes en vene således at kontinuert intravenøs dosering muliggøres. Flere pumper skal om nødvendigt på lignende måde indlægges med ugers interval for at vedligeholde eksponering af teststof. Behandlingen med teststof foregår typisk over 3-5 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 3 måneder. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra tungen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse sygdomsforløbet og/eller teststofkoncentrationen. Post-operativt er det nødvendigt at dyret enkelt-opstaldes da dyret skal have mulighed for at komme sig fuldt efter operationen. Kemiske læsioner af distinkte kerneområder i CNS: En række neurotransmittere, derivater heraf eller syntetiske analoger udøver toksisk påvirkning af nerveceller, der sædvanligvis enten responderer på eller syntetiserer bemeldte transmittere. En række af de nervecellekredsløb, der indgår i kontrol af stofskifte og appetit er således følsomme for neurotoksiske transmittere. Dette forhold kan eksperimentelt udnyttes til at påføre de områder i hjernen, der indgår i regulation af stofskiftet specifikke læsioner, hvorved deres funktionelle betydning for udvikling af sygdom eller behandling af eksisterende sygdom kan afgøres. De neurotoksiske stoffer kunne eksempelvis være mono-natriumglutamat, 5,7-dihydroxytryptofan, eller 6-hydroxydopamin, men langt flere kendes. Neurotoksinet appliceres sædvanligvis lokalt i det område (typisk i striatum eller medial forbrain bundle) der ønskes læderet (via sterotaktisk injektion direkte ind i hjernen på bedøvet dyr). Dyrene vil efterfølgende udvise specifik patologisk funktion, men markante adfærdsændringer ses uhyre sjældent idet læsionerne er meget små. Dyrene enkelttopstaldes i 5 dage medens operationssåret heler, og kan herefter atter gruppeopstaldes.

Motoriske forsøg: I disse forsøg undersøges effekt af teststoffer på motorisk funktion såsom balanceevne og aktivitetsniveau. Disse målinger kan foretages ved at undersøge dyrets evne til at balancere på en roterende pind (rotarod) eller målinger af dyrets aktivitetsniveau via fotoceller monteret i dyrets eget bur eller et testbur. Dyret kan endvidere filmes under testen og filmen efterfølgende analyseres. De kraftigste belastninger af dyret anses derfor at være behandling med teststof og med aktivitets fremmende eller hæmmende stoffer. Rotation: Dyr med beskadigelser af dopaminsystem (neurotoksisk lesion) vil udføre rotationsbevægelser omkring egen akse når dette aktiveres af enten amfetamin eller apomorphin. Antallet af rotationer bestemmes i et automatiseret rotations system hvor antallet af rotationer automatisk registreres. Dyret får en sele omkring livet der er forbundet med et tællesystem. Testen tager maksimalt 30 min. Der forventes en forbipasserende ubehag i forbindelse med stof- induceret rotationer. Efter 4 timer forventes stof- påvirkingen dog at være forsvundet.

Belastningsgraden:

Ubehag Moderat

- beskriv: Der er let til moderat ubehag i forbindelse med selve operationen. Enkelttopstaldning 5 dage efter operation. Dyrene er i perioden efter smertedækket efter behov.

Lidelse Moderat

- beskriv: Den post-operative smertedækning tager den meste smerte. Læsionerne er meget små og derfor med kun let lidelse til følge. Begrænses eller undgås i videst muligt omfang da vantrivsel (lidelse) i forbindelse med

adfærdstest ikke er foreneligt med pålidelige forsøgsresultater.

Smerte Let

– beskriv: Punktering af kar i halespidsen med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig lidelse hos dyret. Let til let moderat smerte i det postoperative forløb. Dyrene bliver smertedækket i denne periode.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv: Læsion af kerneområde i CNS er irreversibel. Foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad.

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 6 Måneder

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte:
Neuroleptanalgesi: Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotter: Non-steroide anti-inflammatoriske lægemidler anvendes en gang i døgnet i op til flere dage. Lokalbedøvelse anvendes evt. også, men kun i forbindelse med ovenstående.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed retter sig efter operationen med fokus på hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang 7 dage efter operation. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til operationen aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotter:
Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.
Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:
Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21;mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipning af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnligt blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydende smerter trods behandling

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter: 200

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

– begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater indenfor Parkinson's sygdom og vil derfor være vigtig i mange år fremover.

Afsnit C-skema nr. C 7

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

Gastric bypass operation i rotter. A) Det overordnede formål er at studere effekter af fedmeoperation (gastric bypass) i en diæt induceret fed rottemodel. Roux-en-Y (RYGB) metoden kombinerer reduktion af mavesækken med en delvis frakobling af tyndtarmen. RYGB er i mennesker den mest anvendte metode og er særdeles effektiv mod svær overvægt og kan kurere stofskiftesygdomme forbundet med svær overvægt som f.eks. type 2 diabetes allerede inden efterfølgende vægttab ses. B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om operationens virkning i en intakt levende organisme. Signalvejene der er involverede i resultatet af en fedmeoperation er et sammenspil mellem mange organer og hjernen, og denne viden kan ikke opnås i en ikke-levende model eller simuleres. B2) Fedmeoperationen RYGB betragtes som den mest effektfulde i både mennesker og dyr og benyttes derfor mest hyppigt. Der er ingen alternative eller mindre belastende operationer eller behandlinger, som ville kunne bruges til at beskrive effekterne af RYGB. Belastningen af de beskrevne dyreforsøg må betragtes som værende af moderat karakter. B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Kendskab til de mekanismer som ligger bag de gavnlige effekter af RYGB vil være særdeles værdifuldt for forskningen i og udviklingen af nye anti-fedme behandlinger, optimeringen af operationsteknikkerne og for langtidseffekterne af fedmeoperationer. Lykkedes det endvidere at identificere mekanismen bag den helbredende effekt på type 2 diabetes, og hvis kendskabet til denne mekanisme kan bruges til at kurere diabetes uden brug af operation, vil det antagelig fundamentalt ændre på behandlingen af denne sygdom. Dette vil radikalt bedre helbredstilstanden og forbedre livsudsigterne for millioner af mennesker verden over.

D) Den egentlige RYGB omfatter dels en reduktion af mavesækkens størrelse samt en ændring af tarmsystemet således, at maden passerer fra den formindskede mavesæk og direkte ind i tyndtarmen uden om tolvfingertarmen, der så i stedet munder ud længere nede i tyndtarmen.

RYGB: Før operationen: Fra 7 dage før operationen enkeltopstaldes dyrene i bure der opfylder krav om størrelse og miljøberigelse og tilbydes de fire første dage energidrik som supplement til normal foder og vand ad libitum som tilvænnning men kun energidrik og vand ad libitum de sidste to dage. Dyrene fastes evt. 24 timer før operationen, således at de i denne periode kun har adgang til vand.

Operationsdagen: Der gives væskebehandling umiddelbart inden og efter operationen. Der opstartes antibiotika og smertestillende behandling. Selve operationen foregår under fuld bedøvelse. Operationen foregår som en åben operation, hvor der åbnes ind til bughulen under sterile forhold. Først deles tyndtarmen ca. 30 cm modsat mavesækkens retning fra det sted, hvor tyndtarmen passerer under tyktarmen. Dernæst laves et lille hul i tyndtarmen ca 10 cm. længere mod blindtarmens åbning og forbindes til åbningen i tyndtarmen af den ende der kommer fra mavesækken. Nu deles mavesækken ved hjælp af en kombineret skærende og klipsende tang, således kun ca. 5% forbliver i forbindelse med spiserøret. Der laves nu en lille åbning i den resterende del af maven, der sidder i forbindelse med spiserøret. Denne åbning forbindes til åbningen i den endnu løse ende af tyndtarmen. Således passerer maden nu fra spiserøret via de 5% mavesæk og direkte ned i tyndtarmen uden om tolvfingertarmen. Den største del af mavesækken sidder nu i enden af tolvfingertarmen uden forbindelse fra spiserøret. Herfra passerer nu galde og sekret fra bugspytkirtlen ud i tyndtarmen. Denne ændring i passagevejen for føde og galde kaldes en Roux-en-Y slynge, hvilket har givet navn til operationen. Til sidst lukkes åbningen i bughulen helt ud til og med huden.

Første uge efter operationen: Dyrene går enkeltopstaldet og tilbydes i op til 7 dage udelukkende energidrik samt almindeligt drikkevand ad libitum. Der gives derudover dagligt væskebehandling, antibiotisk behandling samt smertestillende behandling så længe den veterinære vurdering tilsiger det.

Efter første postoperative uge: Almindeligt foder kunne tildeles i optrappende mængder fra ca fem dage efter operationen. Dyrene vil i denne fase ikke have behov for smertestillende behandling. Såfremt et dyr fortsat 10 dage efter operationen har behov for smertestillende behandling må operationskomplikation mistænkes og dyret vil blive aflivet, hvis tilstanden ikke hurtigt bedres med eksempelvis få dages yderligere antibiotisk behandling. Det er nu muligt at opstalde dyrene parvis. Da disse dyr typisk indgår direkte i teststofforsøg, vil enkeltopstaldningen typisk bibeholdes, da meget præcise observationer af vand og foderindtag er vigtige (varigheden er typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger).

Placebo-operation (sham): Det vil være nødvendigt at operere en gruppe dyr som kontrolgruppe for de udførte RYGB dyr. Her vil RYGB operationen blive udført uden ændringer på tarmens forløb, men med udførelse af tarmkirurgi (adskillelse efterfulgt af resuturering på samme sted). Efter RYGB kan der foretages dosering med teststoffer for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på operationens virkning i rotten. Behandlingen med teststof foregår typisk enten kortvarigt

(1–7 dage) eller over 2–4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant under anæstesi og efterfølgende smertelindring, hvorved der frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. Minipumpen frigiver teststoffet subkutant. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Under eventuelle behandlingsforløb eller som led i orale glukose tolerancetests vil det være nødvendigt at udtage mindre blodprøver fra halespidsen eller tungevenen på bevidste dyr, som anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte indholdsstoffer i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentrationen. Efter RYGB kan det være nødvendigt at MRI scanne dyrene op til en gang ugentligt, for at få et mål for kropssammensætning. Dette vil afsløre om teststoffer har den tilsigtede virkning. Scanningen udføres ved at placere det vågne dyr i en perforeret plasticylinder, hvor det fikseres skånsomt. Selve scanningen tager op til 1 minut men ofte kortere. For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glucosetolerance (dyrenes evne til at optage og deponere sukker). Glucosetolerancen vil blive vurderet ved enten at sprøjte en steril glucose-opløsning ned i maven via en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag). Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver (op til 10 stk) i løbet af maksimalt 5 timer. Mængden af udtaget blod vil være lille og indenfor det anbefalede. Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder.

Efter RYGB kan det være relevant at kigge på spiseadfærd da operationen medfører regulering af appetitfunktion. Derfor kan dyrene placeres i et system der konstant monitorerer føde/drikkevandsindtag og motorisk aktivitet elektronisk. Dyrene går i deres egne kasser, men spiser og drikker evt. via en kanal i burets side, der er tilpasset dyrets størrelse. Dyrene kan her monitoreres over længere tid (op til 8 uger) og tilbydes enten normal eller kalorierig diæt således de kan træffe et valg. Dette kan gøres samtidigt for at vurdere om dyrene har ændret deres fodertypepræference. Der ansøges om tilladelse til at beholde dyr i op til 6 måneder efter RYGB under hensyntagen til de humane endepunkter beskrevet andetsteds. Redegørelse for den på dyrene påførte belastning: Til trods for de anførte forholdsregler skønnes den på de opererede dyr påførte belastning at være betydelig. I forbindelse med operationen vil såvel et døgn faste før operationen, ubehag og risikoen for tarmslyng eller infektion i den første tid efter operationen være de primære elementer i den samlede belastning. Det additive ubehag i forbindelse med eventuel enkelttopstaldning, faste, evt. blodprøvetagning, MRI scanning samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let. Der vil til enhver tid blive taget alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen. De beskrevne indgreb er den maksimale indvirken på dyr i denne type forsøg. I langt de fleste forsøg vil indgrebene være langt mere begrænsede.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

– hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes. De anvendte rotter er enten normale udavlede (f.eks. Sprague–Dawley) eller indavlede (ikke genmodificerede, f.eks. Zucker obese), sidstnævnte repræsenterende dyremodeller for type-2 lignende diabetes og/eller fedme hos mennesker. Udviklingen af mild type 2 diabetes og/eller fedme kan eventuelt ønskes fremprovokeret/accelereret gennem ændringer i kostens energisammensætning. RYGB: Rotten ligger i anæstesi og doseres med 0.1 mg/kg atropin, øjensalve, antibiotikaprofylakse (enrofloxacin 10 mg/kg/dag subkutant) samt smertelindrende. Herefter klippes rotten på maven og huden desinficeres med chlorhexidin. En 3 cm incision ligger i linea alba. Tyndtarmen overskæres 30 cm aboralt for hvor duodenum / proximale jejunum passerer under colon. Jejunum åbnes ca. 3 mm 10 cm i aboral retning fra stedet hvor tarmen er delt og en anastomose laves med den orale ende af jejunum. Nu overskæres og klipses sålede fundus fjernes og efterfølgende ud for den gastro-esophagale overgang, således at kun ca 5% af ventriklen bevares i sammenhæng med esophagus. Ventriklen liggeres til bugvæggen for at undgå rotation og den gastro-esophagale del forbindes via en 3 mm anastomose med den aborale del af jejunum. Til sidst foretages lagvis lukning af bugvæggen og der gives væske subcutant. Der gives 2 dages postoperativ smertebehandling samt antibiotika. Dyrene tilses dagligt og vejes for at følge deres trivsel. Da disse dyr typisk indgår direkte i testofforsøg, vil enkelttopstaldningen typisk bibeholdes, da meget præcise observationer af vand og foderindtag er vigtige (varigheden er typisk kortvarigt 1–7 dage eller over 2–4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Efter RYGB kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 8 uger) for at vurdere om det pågældende teststof eller operationen har effekt i rotten. Teststoffer doseres enten via munden i mavesækken med en sonde (peroralt), under huden (subkutant), i muskelvæv (intramuskulært), i blodbanen (intravenøst) eller i bughulen (intraperitonealt). I nogle tilfælde kan teststoffer ønskes doseret via en osmotisk minipumpe så gentagne stik undgås. Pumpen placeres subkutant via et 1 cm snit der efterfølgende sutureres. Indgrebet foregår under anæstesi og efterfølgende smertelindring. Pumpen frigives teststof kontinuerligt i op til 4 uger. En ny pumpe kan om nødvendigt indlægges for at vedligeholde eksponering af teststof. Efter RYGB kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagende gange fra halespidsen eller tungevenen uden bedøvelse. Punktering af tungevene foretages med 19–21G kanyle. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse af bestemte analytter i blodet eller bestemmelse af teststofkoncentration (PK/PD). For at vurdere teststoffers evne til at forbedre fedme-relaterede sygdomme vil det kunne komme på tale undervejs eller til slut i forsøget at undersøge dyrenes glukose tolerance ved en oral glukose test. Glukose tolerancen vil blive vurderet ved at give en steril glukose-opløsning med en sonde gennem munden. Testen indebærer at dyrene er let fastede natten over (50% af dagligt foderindtag) eller fuld fastede i op til 5 timer før sukkerindgift. Efter sukkerindgift udtages løbende små blodprøver i op til 5 timer (faste tidspunkter fra en time før sukker gives til 4 timer efter). Belastningen ved disse målinger vil være let til moderat og af kort varighed. Mængden af udtaget blod vil være langt indenfor de acceptable grænser for maksimal blodvolumen der kan udtages (<10%). Ved endt måling vil dyrene igen blive tilbudt foder. Efter RYGB kan det være nødvendigt at MRI scanne dyrene op til en gang ugentligt, for at få et generelt mål for kropssammensætning (fordeling af fedt og muskelvæv). Dette vil afsløre om teststoffer har den tilsigtede virkning. Scanningen udføres ved at placere det vågne dyr i en perforeret plasticylinder, hvor det fikseres skånsomt. Selve

scanningen tager op til 1 minut men ofte kortere.

Belastningsgraden:

Ubehag Moderat

- **beskriv:** RYGB: Der vil sandsynligvis være kvalme og ubehag i maven både umiddelbart postoperativt samt i efterforløbet ved hurtig fødeindtagelse. Evt. kan der introduceres yderligere ubehag ved:
Foder-induceret og/eller indavlet type-2 diabetes/fedme. Enkeltopstaldning (varigheden er typisk kortvarigt 1-7 dage eller over 2-4 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 8 uger). Sondedosering. Indlæggelse af osmotisk minipumpe under bedøvelse/smertelindring. Indlæggelse af kroniske katetre under bedøvelse/smertelindring. Tørst eller injektion med LiCl i forbindelse med smagsaversionstest.

Lidelse Moderat

- **beskriv:** De postoperative gener samt det ubehag der kan forekomme ved for hurtig fødeindtagelse og den relativt langvarige opstaldning i enkeltbure skønnes sammenlagt at kunne føre til moderat lidelse. Eventuelle gentagne injektioner eller de eventuelle yderligere operative indgreb kan ligeledes bidrage til den samlede lidelse der opleves af dyret.

Smerte Let

- **beskriv:** Undgås eller begrænses i videst muligt omfang og der gives betydelig smertestillende behandling. På trods af dette kan det ikke udelukkes at dyrene vil opleve smerte i det postoperative forløb, ligesom de dyr som udvikler komplikationer - eventuelt efter at smertebehandlingen er ophørt - sandsynligvis vil opleve smerte før det klinisk bliver åbenbart at komplikationer er indtrådt. Vantrivsel (lidelse) i forbindelse med forsøgene er dog ikke foreneligt med brugbare resultater, hvorfor dyr straks termineres. Punktering af kar i halespidsen eller tungevenen med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig smerte hos dyret.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: Genetisk betinget eller foder-induceret fedme eller type-2 diabetes i mild til moderat grad. Operationen medfører en permanent ændring af forholdene i mave-tarmsystemet. Det kan medføre ubehag ved fødeindtagelse i "for store mængder" ad gangen.

Belastningens varighed Længerevarende

Varighed 6 Måneder

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Rotte:
Inhalationsanæstesi: Isofluran/O₂ inhalation (2-4%).

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Rotte:
0.05 mg/Kg buprenorphine (Vetergesic) SC tre gange dagligt (hver 8. time) gives på dagen for operation sammen med 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl) SC QD. Dette fortsættes i yderligere 3-7 dage. Antibiotisk behandling gives fra operationen og i mindst 1 uge frem. Væskebehandling gives i det postoperative forløb og denne fordeles over 3 subkutane injektioner dagligt i tre dage.

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Rotte: Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som helhed retter sig efter operationen med fokus på hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved vægttab >20% over kort tid (>30% i overvægtige dyr) eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang 7 dage efter operationen. I alle tilfælde af lidelsesvoldende komplikationer til operationen aflives dyret straks.

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Rotte:
Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.
Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:
Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21 mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipping af venstre hjertekammer og højre

forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe.

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Hos alle opererede dyr føres skærpet observation, særligt i den første uge efter operation. I den første uge vejes dyrene dagligt og vurderes mindst 3 gange dagligt af erfarent personale. Dyrene vil også jævnlige blive vurderet af veterinær, hvilket vil ske i alle tilfælde, hvor personale har mistanke om komplikationer eller betydende smerter trods behandling. Den anvendte fremgangsmåde, inklusive præ- og postoperative forholdsregler er adapteret under vores samarbejde med en forskergruppe med stor erfaring i procedurerne (1). 1) Chambers AP et al. Similar effects of roux-en-Y gastric bypass and vertical sleeve gastrectomy on glucose regulation in rats, *Physiol Behav.* 2011 Nov 30;105(1):120-3

Dyreart og antal pr. år:

(Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Rotter:

300 dyr

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

- begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning for forskningen i endnu ukendte effekter af fedmeoperationen gastric bypass RYGB. Udsigten til at finde egnede lægemiddelkandidater som kan kurrere svær overvægt eller stofskiftesygdomme forbundet med svær overvægt som f.eks. type 2 diabetes er langvarige. Virksomheden forventes at være kontinuerligt involveret i arbejde af denne karakter.

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

C 7

Afsnit C-skema nr. C 8

Der skal anvendes et sæt afsnit C-skema for hver forsøgstype/forsøgsrække

Beskriv forsøget generelt: (Denne del af ansøgningen skal kunne forstås af ikke fagfolk og skal omfatte: A) En beskrivelse af forsøgets formål. B) En redegørelse for, at tilsvarende viden kun kan opnås ved anvendelse af levende dyr (B1) og ikke kan opnås ved mindre belastende undersøgelser (B2) eller ved anvendelse af færre dyr (B3). C) En kort redegørelse for antagelsen om, at forsøget er til væsentlig gavn. D) En beskrivelse af samtlige indgreb, der ønskes foretaget på dyrene, herunder en udførlig beskrivelse af den belastning, dyrene herved udsættes for.)

A) Det overordnede formål er at evaluere og validere en in vivo model for Alzheimers sygdom. Alzheimer's sygdom (AD) er en neurodegenerativ sygdom, som oftest resulterer i længerevarende institutionalisering efterfulgt af døden. På nuværende tidspunkt forefindes kun meget få og mangelfulde behandlingsformer til patienter med denne sygdom. AD er karakteriseret af progressivt hukommelsestab, deponering af beta-amyloid peptider i hjernevævet, tab af hjerneceller samt en mængde andre patologiske forandringer. Deponeringen af beta-amyloid peptider menes at være central for udviklingen af den neuropatologi, som er karakteristisk ved AD, og som forårsager patientens gradvise forværring. Formålet med disse studier er at undersøge stoffers evne til at forebygge eller modvirke beta-amyloid deponering i hjernen i genetisk (transgen) musemodel for AD, som udviser denne type af patologi. Sådanne stoffer kunne således tænkes at have forebyggende eller betydelig sygdoms-modificerende effekt i AD patienter. B1) Det er nødvendigt at anvende en dyremodel for at opnå viden om teststoffers virkning i en intakt levende organisme, da både adfærd og mange fysiologiske hændelser styres af et komplekst samspil af biologiske og kemiske processer, som ikke kan genskabes i reagensglasforsøg. Omsætningen af teststoffets virkning på hjernen samt samspillet med andre organer er en viden der ikke kan opnås i en ikke-levende model eller simuleres i en cellekultur. B2) In vivo forsøg er afgørende for eventuelle kognitive forbedringer der ville kunne translateres direkte til humane neurodegenerative sygdomme. B3) Antallet af dyr vil til enhver tid vurderes og reduceres på baggrund af statistiske analyser.

C) Der vil i de kommende år ske en markant stigning i udviklingen primært aldersrelateret hjenesygdomme pga den ældre befolkningstilvækst. De præparater der aktuelt anvendes til behandling af for eksempel AD har ringe effekt og mange bivirkninger. Det vil derfor være til stor gavn at forske indenfor dette område med henblik på udvikling af nye effektive og sikre lægemidler. Forsøg med transgene mus er essentielle i vores biologiske forståelse af svære neurodegenerative sygdomme som AD. Vi har derfor valgt at arbejde med en anerkendt og valideret transgen dyremodel der udviser mange af de humane hukommelsesproblemer man ser hos AD patienter. De adfærdstest vi vil benytte knytter sig til hukommelsespecifik analyse og er sammenlignelige med tilsvarende hukommelsesfunktioner i mennesker. D) Dyrene opstaldes i bure der opfylder krav om størrelse og miljøberigelse. Forud for adfærdsforsøgene kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 6 måneder) for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på indlæring over tid. Teststoffer doseres enten gennem munden med en sonde, under huden eller i muskelvæv. Det generelle forløb af forsøgene er at dyrene doseres med teststof og efter et passende tidsrum undersøges dyrene ved en af de nedennævnte ikke-invasive tests. Disse tests er opdelt i adfærdstests, kognitive tests samt test for motorisk aktivitet. Undervejs i forløbet vil dyrene gennemgå en eller flere adfærdstests da en enkel test ikke altid giver et fuldt billede af adfærdforandringer. Desuden vil der blive anvendt test-stoffer der enten fremmer eller hæmmer hukommelsen hos dyr for at validere de enkelte adfærdstest. Behandling med teststof kan variere fra en enkelt behandling til gentagen behandling over en periode (maksimalt 6 måneder). Under dette behandlingsforløb udtages der evt. mindre blodprøver fra halespidsen på vågne dyr, som anvendes til måling af relevante analytter, der kan bidrage til bedømmelse sygdomsforløbet og/eller teststofkoncentrationen. Adfærdstest omfatter test af indlæringsevne og hukommelse ligesom dyrenes generelle motoriske evner vurderes. Fear conditioning: Til undersøgelse af musenes hukommelsesfunktion bruges "kontekst-relateret frygt indlæring" Dyret skal her huske, at et bestemt miljø er forbundet med ubehag. Det inkluderer en test hvor musen udsættes for et meget kortvarigt elektrisk stød kombineret med en høj ringetone (55dB). Stødet er ubehagelige for dyret, men på ingen måde farligt. Dyret fjernes nu i en periode og når dyret igen sættes tilbage vil den høre samme lyd, men ikke få elektrisk stød. Således kan det på dyrets adfærd ses om den kan forbinde lyd med oplevelsen af stød (effekten betegnes for konditionering). Passive avoidance: Formålet med denne opgave er at teste sted-genkendelse. Dyret placeres i et apparat der har en mørk boks og en lys boks. Da mus foretrækker mørke rum vil de foretrække at være i denne boks. Herinde vil der kunne gives en kortvarig, høj tone (55 dB) samtidig med at et kortvarigt elektrisk stød gives. 24 timer senere placeres dyret i den lyse boks igen, og man måler nu på den tid det tager før dyret går ind i den mørke boks. Har dyret ingen hukommelsesproblemer eller øget hukommelsesfunktion vil det kunne huske at der var et ubehag med den mørke boks, og vil derfor vente længere tid med at gå ind igen. Jo længere tid dyret er om at gå ind i den mørke boks, jo bedre kan det huske. T-maze foot shock avoidance test: I denne hukommelses/indlæringstest placeres dyret i en kasse udformet som et T med en lang gang hvor der er indlagt en afskærmingsvæg i bunden samt to arme med en mål-boks i hver ende af armene. Dyret placeres i bunden. I den første arm dyret går ud i får den et stød fra gulvet. Når dyret nu igen placeres i T'et måles det hvor hurtigt den lærer at den skal gå til den modsatte side og derved undgå siden der giver stød. Novel object test: I denne hukommelses/indlæringstest placeres musen i et område med to objekter som den får lov at undersøge. Efter 24 timer re-introduceres dyret til testen, men denne gang er det ene objekt skiftet ud med et andet og dyret skal nu kunne huske at det tidligere har set det ene objekt. Jo mere tid dyret bruger på at undersøge det nye objekt (i forhold til den kendte objekt) desto bedre hukommelse. Motoriske forsøg vil udføres af en roterende pind som dyret skal balancere på eller simple målinger af dyrets aktivitetsniveau i dets eget bur eller et specialdesignet testbur. I disse forsøg undersøges effekt af teststoffer på motorisk funktion såsom balance-evne og aktivitetsniveau. Disse målinger kan foretages ved at undersøge dyrets evne til at balancere på en roterende pind (rotarod) eller målinger af dyrets aktivitetsniveau via fotoceller monteret i dyrets eget bur eller et testbur. Dyret kan endvidere filmes under testen og filmen efterfølgende

analyseres. De kraftigste belastninger af dyret anses derfor at være behandling med teststof og med aktivitets-fremmende eller -hæmmende stoffer. Ved de forskellige adfærdstest er der en overordnet indlæringsfase med daglige tests efterfulgt af en længere hvilepause (typisk 2-5 dage) hvorefter dyrene testes igen. Samlet set vil en adfærdstest af en given overordnet type, typisk have en varighed på 2 til 21 dage. Dyr, der testes i et testsystem, kan godt testes efterfølgende i et andet forudsat at der er minimum 14 dages pause imellem to uafhængige tests. Under enkelte adfærdstests er det nødvendigt at dyret enkeltopstaldes (i op til 21 dage hvor adfærdsforsøgene laves) da stress-påvirkningen ved at blive taget fra sit hjemmibur og gen-introduceres til flokken gentagne gange samme dag forventes at være større end ved enkelt opstaldning i den periode som adfærdstesten forventes at pågå. Da stress kan påvirke forsøgene er det vigtigt at belastningsgraden for det enkelte dyr er så ens som mulig. Redegørelse for den på dyrene påførte belastning: Belastningsgraden af adfærdstests vurderes til at medføre let til moderat grad af ubehag (under fear-condition test) og let smerte ved elektrisk stød i foden. Hvis et dyr ikke har bevæget sig efter 30 sekunder fjernes det omgående. Da der hurtigt gribes ind skønnes testen kun at medføre let ubehag. Det er ikke forlignelig med dette forsøg at smertebehandle dyrene. Det additive ubehag i forbindelse med tests, evt. enkeltopstaldning, samt eventuelle gentagne stik i forbindelse med dosering vurderes at være let, da der tages alle tilgængelige forholdsregler for at optimere forsøgsdesign og derved minimere belastningen og hele tiden lade dyrene kunne bevæge sig frit.

Skyldes forsøgene krav fra myndighed, som led i godkendelse af stof eller produkt? Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv nærmere:

Beskriv forsøgets type, art og forløb, herunder de planlagte indgreb og påvirkning af organfunktioner:
(Der vedlægges evt. forsøgsprotokol. Der angives og begrundes, hvorvidt de givne oplysninger skal hemmeligholdes.)

Oplysningerne skal ikke hemmeligholdes.

De anvendte mus er enten normale udavlede eller genmodificerede (transgene) APP/PS1 mus (se G3 ansøgning). Sidstnævnte repræsenterer en dyremodel for AD hos mennesker. Forud for adfærdsforsøg kan der foretages dosering med teststoffer af en eller flere dages varighed (op til 6 måneder) for at vurdere om det pågældende teststof har effekt på hukommelse og indlæring. Teststoffer doseres enten peroralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonealt. Behandlingen med teststof foregår typisk over 3-5 uger, men kan i meget sjældne tilfælde vare i op til 6 måneder, idet hukommelsesfremmende stoffer kan have en langsomt virkende effekt. Hukommelsesfunktion kan ønskes nedsat med hukommeshæmmende stoffer eller forbedret med stoffer med pro-kognitiv effekt som enten øger hukommelsesevnen eller modvirker effekten af et hukommeshæmmende stof. I de motoriske tests kan dyret behandles med stoffer som enten fremmer eller hæmmer dyrets hukommelsesfunktion og motorisk aktivitet. Under behandlingsforløbet kan det være nødvendigt at udtage blodprøver gentagne gange fra halespidsen uden bedøvelse. Blodprøverne anvendes til måling af relevante parametre, der kan bidrage til bedømmelse sygdomsforløbet og/eller teststofkoncentrationen. Dyrene vil blive udsat for en eller op til tre tests, da en enkelt test ikke altid giver et fuldt billede af hvor robust hukommelsesfunktionen er i dyrene. Adfærdstests vil kun blive udført på ikke-drægtige dyr der mindst er 40 dage gamle. Disse bedømmer forskellige grader af indlæringssevne og hukommelse ligesom dyrenes overordnede motorik kan vurderes. Ved udførelsen er der en overordnet indlæringsfase med daglige tests efterfulgt af en lang hvilepause (typisk 2-5 dage) hvorefter dyrene testes igen. Samlet set vil en adfærdstest af en given overordnet type, typisk have en varighed på 2 til 21 dage. Dyr, der testes i et testsystem, kan godt testes efterfølgende i et andet forudsat at der er minimum 14 dages pause ('wash-out') imellem to uafhængige tests (se nedenfor). Et dyr vil ikke blive udsat for mere end maksimalt 4 adfærdstest. Hukommelsestest: Fear conditioning: Til undersøgelse af musene hukommelse bruges "kontekst-relateret frygt indlæring". Dyret skal her huske, at et bestemt miljø er forbundet med ubehag. Dette opnås ved at dyret tilbringer tid i miljøet, hvorefter en tone lyder og den får 3 kortvarige (1 sekund) stød (0,35 mA). Stødene er ubehagelige for dyret, men på ingen måde farlige. Musens hukommelse for miljøet testes 2 gange i den efterfølgende måned efter indlæringen ved at sætte den tilbage i miljøet (uden at give stød) men kun varsle stødene ved tonesignaler og observere dens adfærd. Passive avoidance: Formålet med denne opgave er at teste sted genkendelse, som er en form for episodisk hukommelse, i mus. Dyret placeres i et apparat der har en mørk boks og en lys boks. Da mus foretrækker mørke rum vil de trække ind i denne boks. Herinde vil der lyde en høj lyd (55 dB) samtidig med at et stød gives. 24 timer senere placeres dyret i den lyse boks igen, og man måler nu på den tid det tager før dyret går ind i den mørke boks. Har dyret ingen hukommelsesproblemer vil det kunne huske at der var et ubehag med den mørke boks. T-maze foot shock avoidance test: T-mazen består af en plastik-formet apparatur der er formet som et T med en lang gang indlagt en afskærmingsvæg samt to arme med en mål-boks i hver ende af armene. I gulvet løber der et gitter der kan afgive et mildt fodstød (0,35 mA). Desuden anvendes en ringtone på 55 dB. Dyrene skal lære at skifte præference fra den ene arm til den anden. Ved indlæringsforsøget præsenteres dyret i den lange arm bagved en adskillelsesvæg (start boks). Dernæst fjernes væggen og ringtonen lyder samtidig. 5 sekunder senere gives et mildt fod-stød. Den første arm musen dernæst går ind i bliver betegnet som "forkert" for den mus. Der vedblives at give et fod-stød indtil musen går ind i den anden arm der betegnes som den "korrekte" arm. Så snart dyret er i den korrekte arm føres musen tilbage til sit hjemmibur. Træningen fortsætter indtil dyret laver 1 avoidance (dvs går direkte ind i den "korrekte" arm). Jo færre forsøg dyret skal bruge for at lave en enkel avoidance jo bedre indlæring. 1 uge senere kan man måle retention (genkaldelseshukommelsen). Musene fortsætter træning men denne gang slutter det ikke før at dyret har opnået et kriterie fx 5 korrekte besøg ud af 6 forsøg. Jo færre forsøg forend kriteriet er opnået jo bedre langtidshukommelse (working memory). Novel-object test: et åbent område (open field) med to objekter placeret i testområdet. Dyret skal starte med at afsøge to ens objekter i 3-5 minutter. Dernæst fjernes dyret og genindsættes i arenaen efter 24 timer. Denne gang er det ene objekt skiftet ud med et andet og dyret skal nu kunne huske at det har set det ene objekt før. Jo mere tid dyret bruger på at undersøge det nye objekt desto bedre hukommelse. Motoriske forsøg: I disse forsøg undersøges effekt af teststoffer på motorisk funktion såsom balanceevne og aktivitetsniveau. Disse målinger kan foretages ved at undersøge dyrets evne til at balancere på en roterende pind (rotarod) eller målinger af dyrets aktivitetsniveau via fotoceller monteret i dyrets eget bur eller et testbur. Dyret kan endvidere filmes under testen og filmen efterfølgende analyseres. De kraftigste belastninger af dyret anses derfor at være behandling med teststof og med aktivitets fremmende eller hæmmende stoffer.

Belastningsgraden:

Ubehag Moderat

- beskriv: Belastningsgraden af adfærdstests vurderes generelt til at medføre let til moderat grad af ubehag (under fear-condition test) og let smerte ved et kortvarigt elektrisk stød i foden. Enkeltopstaldning i op til 21 dage. Evt. sondedosering.

Lidelse Ingen

- beskriv: Begrænses eller undgås i videst muligt omfang da vantrivsel (lidelse) i forbindelse med adfærdstest ikke er foreneligt med pålidelige forsøgsresultater.

Smerte Let

- beskriv: Punktering af kar i halespidsen med lancet samt IP/IV/IM dosering kan opleves som kortvarig lidelse hos dyret. Enkeltopstaldning under T-maze adfærdsforsøg samt mild smerte ved stød i foden (0.35 mA) i 1 sekund gentagende gange under indlæring.

Påvirket bevægelsesfrihed Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv:

Påføres varigt mén Ja Nej

- hvis "Ja", beskriv: Genetisk betinget hukommelsesproblemer

Belastningens varighed Kortvarigt

Varighed 12 Måneder

Aflives i bedøvelsen (uden på noget tidspunkt at være vågnet op efter forsøgets indledning): Ja Nej

Beskriv den anvendte anæstesi for hver dyreart:

Det vil ikke være nødvendigt at ligge dyrene i anæstesi

Beskriv den påtænkte smertebehandling og anden lindrende behandling for hver dyreart:

Det vurderes ikke nødvendigt at smertedække dyrene

Angiv de velfærdsmæssige kriterier (humane endpoints) for afbrydelse af forsøget for hver dyreart:

Primært en veterinær helhedsvurdering med fokus på om dyret som trives med fokus på hydreringsgrad, urinproduktion, fæcesafgang, udseende, aktivitetsniveau og ædelyst. Aflivning vil altid blive foretaget umiddelbart ved væggtab >20% over kort tid eller ved manglende fødeindtag eller fæcesafgang 7 dage .

Angiv aflivningsmetoden for hver dyreart:

Mus:

Overdosis pentobarbital eller CO₂/O₂ inhalation.

Perfusionsfiksering hvis hjerne eller andre organer udtages til grundig histologisk undersøgelse:

Neuroleptanalgesi (Fentanyl 0,21 mg/kg SC, fluanisone 6,75 mg/kg SC, midazolam 3,375 mg/kg SC) eller pentobarbital+lidokain IP (50 mg/kg IP) efterfulgt af komplet afblødning ved opklipning af venstre hjertekammer og højre forkammer og perfundering af blodbanen med fiksativ leveret med pumpe. Der skal eventuelt også udtrækkes cerebrospinalvæske fra rygmarven efter CO₂/O₂ inhalation, men dyret aflives ved nakketræk lige umiddelbart efter,

Beskriv pasningen af og tilsyn med dyrene, herunder særlige foranstaltninger ved tilsyn:

Dyrene passes efter dyrestaldens forskrifter med minimum et dagligt tilsyn og dyrene vejes minimum 1 x ugentlig. Der føres som minimum jævnligt veterinært tilsyn med dyrene, ellers efter behov.

Dyreart og antal pr. år:

Der ønskes en redegørelse for valget af dyreart. Såfremt der påtænkes anvendt genetisk modificerede dyr, skal der indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr, mv. Ansøgeren skal i så fald anvende et G-skema for hver variant. Såfremt der påtænkes anvendt klonede dyr, skal indgives særskilt ansøgning herom i henhold til lov om kloning og genmodificering af dyr mv. Ansøgeren skal så fald anvende et F-skema for hver gruppe af klonede dyr.)

Transgene mus: (skema G udfyldt)

200

Ønsket varighed af tilladelsen til det beskrevne forsøg angivet i antal år: 5

- begrund:

Denne forsøgsprotokol er af generel betydning i udvælgelsen og udviklingen af lægemiddelkandidater indenfor AD og vil derfor være vigtig i mange år fremover.

Der kan medsendes en redegørelse med begrundelse for, hvorfor ansøgeren finder, at betingelserne i offentlighedslovens §§ 12 og 13 for at nægte aktindsigt er tilstede.

C 8

Afsnit G-skema nr. G 1

Ansøgning om tilladelse til anvendelse af GENETISK MODIFICEREDE DYR, jfr. lov om kloning og genmodificering, i forbindelse med dyreforsøg.

Skemaet anvendes for forsøg, der er beskrevet nærmere i ansøgningens Afsnit C - skema nr.: Afsnit C 8

Dyreart Mus Musculus	Genkode Tg(APP ^{swe} ,PSEN1 ^{dE9})85Dbo
Stammebetegnelse C57/black 6J/APP/PS1	Beskrevet genetisk modifikation Andet Ved andet, beskriv Dobbelt transgen mus med en kimærisk mus/human amyloid precursor protein (Mo/HuAPP695 ^{swe}) og en mutant human presenilin 1 (PS1-dE9) (transgene insertion 85, David R Borchelt)
Oprindelse/Leverandør	The Jackson Laboratory (via MMRRRC, Mutant Mouse Regional Resource Center, National Institute of Health, USA)
<p>Beskriv, hvorfor det skønnes nødvendigt eller formålstjenligt for forsøget at anvende genmodificerede dyr</p> <p>Vi forsker blandt anden indenfor Alzheimers sygdom. Den anførte model er en valideret transgen model indenfor Alzheimersforskningen og vi ønsker derfor at gøre brug af denne i forbindelse med undersøgelse af nye potentielle lægemidler til behandling af Alzheimers syge. Vi ønsker at undersøge eventuelle indlærings- og hukommelsesmæssige forbedringer ved hjælp af anerkendte adfærdsmodeller. Desuden ønskes musene anvendt til farmakokinetiske studier, især med henblik på optagelse og fordeling i hjernen. Dette gøres for at kunne fastlægge en sikker dosis af stof ved senere kliniske afprøvninger.</p>	
<p>Beskriv de molekulære og fysiologiske ændringer som forventes i homo- og heterozygoter (Herunder ønskes oplysning om nedsat levedygtighed, nedsat fertilitet, fosterdød, neonatal mortalitet og adfærdsændringer.)</p> <p>Det humaniseret transgene allel (Mo/HuAPP695^{swe}) medvirker til en dannelse af det humane A-beta peptid. Den inkluderet "swedish" mutation (K595N/M596L) forøger mængden af A-beta produktionen i kombination med det transgene humane mutant protein presenilin (PS1-dE9). Disse genetiske mutationer bevirker at musene ved seks-syv måneders alderen ophober beta-amyloid plaques i hjernen der er forbundet med gradvis indtræden af hukommelsesvanskeligheder. Desuden får ca 55% af musene epileptiske anfald omkring 4.5 måneders alderen der kan måles ved video-EEG. I forbindelse med de epileptiske anfald forventes der en mortalitetsrate på mellem 10-15% op til 38% afhængig af den genetiske baggrund.</p>	
<p>Beskriv eventuelt fænotypiske ændringer som forekommer i homo/heterozygoter</p> <p>De transgene mus udtrykker højt niveau af humant Alzheimer beta-amyloid precursor protein (Abeta-APP) i hjernen. Musene får en mindre forandring i halen grundet deres genetiske baggrund</p>	
<p>Specificer og beskriv sygelighed eller anden belastning af dyrenes velfærd fremkaldt af den genetiske modifikation</p> <p>Indlærings- og hukommelsesbesvær. Musene kan udvise en høj grad af epileptiske anfald målt ved video-EEG. Ca 25 % udviser ved 3 måneders alderen mindst 1 anfald. Dette stiger med alderen til omkring 55 %. I forbindelse med de epileptiske anfald forventes der en mortalitetsrate på op til 38 %10-15%.</p>	
<p>Specificer og vurder den mulige ekstra belastning, som opstår på grund af, at det påtænkte forsøg, der beskrives i Afsnit C, skema nr. , udføres på genetisk modificerede dyr</p> <p>Ingen udover hvad der er beskrevet i skema C. Det kan eventuelt forventes at transgene mus kommer til at opleve flere stød i forbindelse med enkelte adfærdstest end deres vildtype grundet deres indlæringsproblemer.</p>	
<p>Anfør de dyreværnsmæssige forholdsregler der agtes iværksat for at imødegå disse belastninger</p> <p>Hvis et dyr i indlæringsfasen udviser en under forventelig præstation i en aversiv adfærdsmodel vil dyret blive betragtet som en out-lier og udgå af eksperimentet. På denne måde vil dyret ikke komme til at lide unødigt overlast.</p>	