

Institutional animal care and use committee statement

Name of Journal: World Journal of Gastroenterology

ESPS Manuscript No: 28458

Title: Sex Differences and Effects of Oestrogen in Rat Gastric Mucosal Defence

Authors list: Shore R, Björne H, Omoto Y, Siemiatkowska A, Gustafsson JÅ,
Lindblad M, Holm L

Correspondence to: Richard Shore, MD, Department of Clinical Sciences,
Intervention and Technology (CLINTEC), Karolinska Institutet, Stockholm S-14186,
Sweden; Department of Anaesthesiology, Surgical Services and Intensive Care
Medicine, Karolinska University Hospital, Stockholm S-17176, Sweden

Institutional animal care and use committee statement: All procedures involving animals were reviewed and approved by the Regional Ethical Committee for Laboratory Animal Experiments in Uppsala (IACUC protocol (Swedish) number: C288/9).

Stockholm 2016-08-29



Richard Shore, MD

Corresponding author



UPPSALA
UNIVERSITET

Lena Holm
Professor

Department of
Medical Cell Biology
Division of Integrative Physiology

Box 571
SE-751 23 Uppsala

Visiting address:
Husargatan 3, BMC B1:2

Phone:
+46 18 471 4325

Fax:
+46 18 471 4938

www.medcellbiol.uu.se

Lena.Holm@medcellbiol.uu.se

T. Mager
Uppsala djurförsöksetiska nämnd
Ink. 16/1 2 20 10
Dnr. C 288/9

Uppsala Djurförsöksetiska nämnd
Uppsala Tingsrätt
Box 1113
751 41 Uppsala

Reviderat tillägg till ansökan nummer C 288/9 samt nummer C 110/8

Ovan nämnda ansökningar är godkända sedan tidigare och i dessa studier undersöks magtarmkanalens normala funktioner och skyddsmekanismer i råttor och möss. Önskar nu använda 30 av dessa råttor (C 288/9) samt 30 av dessa möss (C 110/8) för att studera östrogenets påverkan på magtarmkanalens skyddsmekanismer.

Han och hon råttor och möss ska ges östrogenagonister dels vid akutförsök och dels som förbehandling. Förbehandling ges som subkutan slow release infusion. Östrogen löses i sesamolja (180 µg/ml) och en silicontub fylls med 100 µl eller 35 µl, till råttor resp mus, av denna lösning och inplanteras sedan under huden i nacken. Denna slow release behandling utförs en gång och djuren undersöks 3 veckor senare

Bakgrunden till att vi vill studera könsskillnader vad gäller magtarmkanalens normala funktioner samt skyddsmekanismer är att det finns stora skillnader i frekvensen av magsäckscancer, kolon cancer samt duodenal ulcus mellan män och kvinnor i fertil ålder. Det finns starka indikationer på att det som skyddar kvinnor är östrogenet. Vi vill därför studera könsskillnader samt östrogenets påverkan på magtarmkanalens funktioner.

Veterinär och djurförsöksansvarig har godkänt tillägget

Uppsala 2010-02-16

Lena Holm

Hellman Emma - TUP

Från: Marianne Jensen-Waern [Marianne.Jensen-Waern@kv.slu.se]

Skickat: den 16 februari 2010 17:04

Till: Lena Holm; Hellman Emma - TUP

Ämne: SV: Etisk ansökan, tillägg C288/9 samt C 110/8

Hej!

Jag har läst det reviderade tillägget C288/9 samt C110/8 och finner att detta tillägg nu kan tillstyrkas. Emma, kan du ordna med formalia så att beslut kan fattas på plenarmötet den 26 februari.

Tack så mycket,
Marianne

Från: Lena Holm [mailto:lena.holm@mcb.uu.se]

Skickat: den 16 februari 2010 16:46

Till: Hellman Emma - TUP

Kopia: Marianne Jensen-Waern

Ämne: Re: Etisk ansökan, tillägg C288/9 samt C 110/8

Hej Emma

Har diskuterat med Marianne om tilläggsansökan som var alltför omfattande. Har nu reviderat tillägget och vore mycket tacksam om du kunde expediera detta ärende så fort som möjligt. Marianne har lovat att genast titta på det reviderade tillägget.

mvh

Lena

Information from ESET NOD32 Antivirus, version of virus signature database 4871
(20100216)

The message was checked by ESET NOD32 Antivirus.

<http://www.eset.com>

Information from ESET NOD32 Antivirus, version of virus signature database 4871
(20100216)

The message was checked by ESET NOD32 Antivirus.

<http://www.eset.com>

Tillag
Dnr C 288/9

KOMPLETTERANDE UPPGIFTER TILL ANSÖKAN

OBS! Om nya eller kompletterande uppgifter muntligen tillförs under ärendets beredning skall dessa antecknas nedan genom beredningsgruppens försorg eller av den djurförsöksetiska nämnden.

BEREDNINGSGRUPPENS FÖRSLAG TILL NÄMNDENS STÄLLNINGSTAGANDE

Datum

Namnunderskrifter och namnförtydliganden

DEN DJURFÖRSÖKETISKA NÄMNDENS BESLUT

Om inte annat sägs i beslutet gäller detta under tre år från dagen för beslutet

☒ Godkänns ☐ Ayslås

☐ Godkänns med följande villkor:

2010-02-26

Datum

Ordförandens namnunderskrift

Motivering och ev. avvikande mening, se protokollet. I förekommande fall hur man överklagar, se bilaga.



ANSÖKAN -etisk prövning av djurförsök

Datum 2009 september 28

Denna blankett är fastställd av Centrala försöksdjursnämnden (CFN) den 28 september 2001.
Vägledning för att fylla i blanketten finns att hämta på Jordbruksverkets webbplats (www.sjv.se).
Ansökan lämnas till den djurförsöksetiska nämnd inom vars verksamhetsområde det planerade djurförsöket ska utföras.

Uppsala djurförsöksetiska nämnd
Ink. 30/9 2009
Dnr. C288/9
(inlämnat telefax 29/9)

☐ I ansökan bör med motivering anges vilka uppgifter som enligt sökanden kräver sekretess

Uppgifter om sökanden (försöksledaren)

Namn Lena Holm		
Institution, avdelning eller motsvarande Institutionen för medicinsk cellbiologi, enheten för integrativ fysiologi		
Telefonnummer (även riktnr) 018-4714325	Faxnummer (även riktnr) 018-4714938	E-mail lena.holm@mcb.uu.se
Adress Husargatan 3, BMC B1:2, Box 571		Postadress 751 23 Uppsala

Ansökan är en fortsättning av tidigare provade försök

Diariumnummer
C217/6

- ☐ Försöket avser framställning av genetiskt modifierade djur
- ☐ Försöket avser användning av genetiskt modifierade djur

Försöksledarens klassificering av försökets svårighetsgrad (endast ett alternativ skall anges)

- ☒ Ringa svårighetsgrad ☐ Måttlig svårighetsgrad ☐ Avsevärd svårighetsgrad

Uppgifter om det planerade djurförsöket

Sidorna 1-3 i ansökningsblanketten fylls i av den sökande. OBS! Vid uppgiftslämnandet skall ett enkelt språk användas. Viktigt är också att tillräckliga uppgifter lämnas för den djurförsöksetiska nämndens bedömning av försöket.

1. Projektets titel

Magtarmkanalens normala funktioner och skyddsmekanismer mot saltsyra, digestionsenzym, bakterieprodukter och andra skadliga agens

2. Syftet med djurförsöket och eventuell redovisning av tidigare resultat

I magsäcken produceras en enormt stark syra som tillsammans med digestionsenzymer kan orsaka slemhinneskador om inte skyddsmekanismerna fungerar perfekt. Dessutom intas mat och dryck som kan vara skadligt både kemiskt och mekaniskt (nötning på slemhinnan). I tjocktarmen (kolon) finns ungefär 1,5 kg bakterier av olika stammar, där vissa är goda och andra skadliga. Som skydd mot skadliga endogena och exogena ämnen/bakterier existerar ett tjockt täckande slemlager, bikarbonatsekretion som neutraliserar syran och ett adekvat blodflöde som förser vävnaden med syrgas och näringsämnen samt transporterar bort skadliga ämnen som penetrerat ner i slemhinnan. Här finns också ett välutvecklat immunsystem.

Det är dock mycket vanligt att störningar i form av inflammationer (gastrit/inflammatorisk tarmsjukdom) eller ibland även sår på slemhinnan (ulcus) uppstår i dessa organ. *Helicobacter pylori* är numera en accepterad patogen hos människa och en av flera faktorer som kan orsaka dessa störningar. Vi vill studera mag-tarmkanalens normala funktioner och hur den lyckas upprätthålla skyddet mot skadliga ämnen samt bakterier. Studierna omfattar reglering av blodflöde, slemsekretion, syra- och bikarbonatsekretion, surhetsgrad (pH) i slemlagret, slemhinnans täthet (permeabilitet) liksom inflammatoriska mediatorer.

Vi mäter blodflödet både på djupet och i de ytligaste blodkärlen i slemhinnan för att utröna blodfödets roll vid sekretionsprocessen samt som skyddsfaktor. Mätningar av slemsekretionen görs för att studera hur den regleras normalt samt förstå dess roll som skyddsbarriär mot innehållet i mag-tarm-lumen. Våra studier har visat att det bildas en pH gradient i slemlagret med ett nästan neutralt pH vid slemhinneytan trots ett surt pH i maglumen. Den bikarbonat som utsöndras av slemhinnan är viktig för uppbyggnaden och upprätthållandet av denna gradient och således mycket viktig för skyddet mot syran som produceras i magsäcken. Vi har tidigare också visat att om magslemhinnan exponeras för toxiner från *helicobacter pylori* så försämras både slemsekretion och blodflöde. Detta i sig föreslår att skador på slemhinnan beror på en obalans mellan magens skyddsmekanismer och de aggressiva faktorer den utsätts för. Vi har även studerat slemtäckets tillväxt och tjocklek i hela magtarmkanalen och funnit att slemmet kan delas in i två olika lager. I magen och tjocktarmen är det inre lagret omöjligt att suga bort, medan det i tunntarmen kan avlägsnas men mycket snabbt tillväxer. Möjligen kan skillnader i slemkonsistens och tillväxt avspegla olika funktioner i de olika delarna av magtarmkanalen. Dessa differenser utreds nu och vi har funnit att det yttre slemlagret som täcker det inre slemlagret inte bidrar till upprätthållandet av ett neutralt pH vid epitelcellerna vid luminal syra. Dock har vi nyligen publicerat resultat som visar att nitrit (efter intag av nitrat) ansamlas i det yttre löst adherenta slemlagret. I den sura miljön bildas NO av nitrit och på så sätt får nitriten en längre verkningslängd i magsäcken. Vi har visat att nitrit/NO i magsäcken skyddar magsäcken mot skadeagens genom att öka blodflödet och slemproduktionen. Detta visar också att även det yttre slemlagret kan ha en viktig skyddande funktion för slemhinnan.

Vi studerar nu reglering av tillväxten och beståndsdelarna av slemlagren. Dessutom har vi börjat ett nytt spår: att undersöka bakterier i de olika slemlagren. Hur bakterieinnehållet fördelas mellan lagren och hur det påverkas av probiotika och prebiotika (se nedan).

Speciellt vill vi undersöka hur icke nedbrytbara kolhydrater, som vid fermentation i tjocktarmen bildar korta fettsyror, f.a. smörtsyra, påverkar kolonslem och slemhinna. Det finns indikationer på att vissa av dessa kolhydrater (prebiotika) skyddar mot inflammatoriska tarmsjukdomar och i förlängningen också mot tjocktarmscancer. Skyddet kan bero på att fettsyrorna i sig påverkar epitelcellerna positivt och/eller att de utgör substrat till "goda bakterier", sk probiotika. Dessa bakterier kan också medverka i bildandet av fettsyror. Vi vill också studera hur probiotika i sig påverkar kolonslem/slemhinna samt var de koloniserar. Bakgrunden till att vi vill studera hur probiotika påverkar magtarmkanalens normala funktioner är att vi nyligen publicerat resultat som visar att de skyddar mot DSS inducerad kolit i råttor.

3. Andra metoder än den valda

Uppgifter skall kortfattat lämnas om det finns andra metoder, med eller utan användning av djur, för att uppnå syftet med försöket

I dagsläget finns inte någon metod som kan jämföras med vår integrerade in vivo preperation. I vår heldjursmodell kan vi bibehålla ett intakt blodflöde med en kontinuerlig slemstillväxt i olika delar av magtarmkanalen. För blodflödesmätningar krävs ett intakt cirkulationssystem. Korrekta slemmätningar kan också bara göras in vivo. Histologiska metoder, förstör mucinernas struktur och ger ingen möjlighet att följa realtidstillväxten av slemmet.

4. Dokumentationskrav

Om nationella eller internationella dokumentationskrav genom djurförsök föreligger, skall uppgifter som styrker behovet av försöket angas

Vi följer GLP.

5. Valet av djurart, ras och stam

Djurart Råttor: Sprague Dawley	Totalt antal djur 150/år
Motivering för val av djurart med karaktärisering av djuren Råttan används på grund av lång erfarenhet och mycket försöksresultat finns från detta djurslag. Vi har goda erfarenheter av adekvat anestesi under lång tid hos råttor. Råttan är också intressant då vi konkret kan jämföra våra resultat från tidigare funna resultat i samma modell. Råttorna används till dessa försök när de är cirka 50 dagar gamla, eller väger mellan 180-220 gram.	

6. Försökets tids- och genomförandeplan

Försöket beräknas påbörjas snarast	Försöket pågår t o m tre år framåt
<p>Beskrivning av försökets uppläggning och genomförande skall göras med tyngdpunkt på de ingrepp som görs, olika momentis varaktighet m m</p> <p>Djup narkos induceras innan försöket och djuret hålls konstant vid en temperatur av 37-38°C genom en rektaltermometer kopplad till en termistor och en värmedyna. Narkosdjupet kontrolleras genom att iaktta andningen som skall vara lugn och regelbunden samt kontroll av utslagen blinkreflex alternativt böjreflex vid nyp i tassen. Det kirurgiska ingreppet tar 20-45 minuter. Djuret tracheotomeras för att underlätta spontan andning. V. femoralis kateteriseras för blodprovstagning eller infusion av elektrolyter eller olika farmakologiska verktyg med en infusionshastighet på 1.0 ml/h. Vidare kateteriseras a. femoralis för kontinuerlig blodtrycksregistrering som används bl.a. för kontroll av narkosdjup och allmäntillstånd. Buken öppnas och den del av mag-tarmkanalen som ska studeras öppnas med intakta kärl och nerver för att kunna studera slemhinnan. I vissa försök öppnas ej tarmen utan istället monteras den så att det intilliggande fettet kan undersökas.</p> <p>Slemsekretion och slemthjocklek mäts med en mikropipett kopplad till en mikromanipulator som förs försiktigt in i slemmet. För analys av bakterieinnehåll sugas och skrapas slemmet bort. På så sätt kan vi analysera bakterieinnehållet i de olika slemlagren som vi identifierat. Dessutom ska mesenteriska lymfnoder också analyseras på bakterieinnehåll. Bakterieanalyser utförs på mikrobiologen, SLU, Stefan Roos laboratorium.</p> <p>Blodflödet i de olika organen mäts med mikrosfärsteknik för absolutflöden och med laser-doppler flödesteknik för kontinuerlig registrering. Vita blodkroppars och trombocyters adhesion till endotelceller mäts direkt från videon eller med antikroppsteknik där radioaktivt märkta adhesionsmolekyler injiceras och sedan mäts i de olika organen i magtarmkanalen. Sekretion av syra eller bikarbonat mäts genom titrering av den lösning som täcker slemhinnan. Slemhinneskada (permeabilitet, eller förändring i vävnadstäthet) mäts med 51Cr-EDTA/mannitol/urea-clearance och pH i slemlagret med mikroelektroder som förs in i slemlagret och är fyllda med en vätejonkänslig lösning. Lymforgan (Peyers plack och mesenterielymfkörtlar) dissikeras fram, homogeniseras och celltyper bestäms med FACS.</p> <p>Flera av mätningarna kan utföras i samma djur vilket minimerar antalet djur som behövs och ger mycket information från varje djur. Försöken pågår i 5-6 timmar. Det är akutförsök och djuren avlivas direkt efter försöket. Vissa av djuren ska förbehandlas med syraproduktionshämmare (omeprazole 1-8 dagars förbehandling), NSAID-preparat (naproxen/diclofenac/indometacin 24 tim- 1 v före försöken) eller kväveoxidsyntas-hämmare (L-NIL, L-NNA, eller 7-NI, 0,5 timme före sövning).</p> <p>Vissa djur kommer att förbehandlas med probiotika. Probiotika är bakteriekulturer med dokumenterat positiva effekter i magtarmkanalen. Det är idag vanligt att dessa typer av bakterier sätts till <u>SLU</u> mejeriprodukter och andra livsmedel. Vi har en etablerad kontakt med Stefan Roos på <u>SLU</u> som förser oss med kända bakteriestammar. Djuren sondmatas med bestämda mängder av dessa bakteriekulturer (max 0,5 ml), framför allt Lactobacillus Reuteri, dagligen i upp till 14 dagar innan försöken. Vi har stor erfarenhet av detta sedan tidigare, djuren sväljer själva ned slangen tills den är i magsäcken och är helt opåverkade av proceduren. Vi önskar börja behandla råttorna med bakterier direkt när djuren anländer eftersom djuren vid försökets genomförande inte bör vara större än drygt 200g. Detta har vi godkända tillägg för i tidigare ansökan C217/6; C296/7.</p> <p>Vi vill också behandla vissa av djuren med prebiotika. Prebiotika är onedbrytbara kolhydrater som bildar korta fettsyrekedjor i tjocktarmen. Dessa fettsyror, främst smörtsyra, verkar dels som substrat för "goda bakterier" i tarmen men har även i sig visat sig ha positiva effekter vid inflammatorisk tarmsjukdom. Vi samarbetar med professor Margareta Nyman på Lunds Universitet, som kan tillhandahålla kost till djuren rik på prebiotika. Vi vill ge prebiotika-kosten direkt när djuren anländer och låta djuren äta den i upp till fem veckor före försöken. Anledningen till att vi vill ge djuren kosten direkt när de anländer är att vi ser det som ett onödigt stressmoment att djuren först får en typ av kost hos uppfödaren, sedan en ny kost i en vecka i vårt djurhus, följt av en tredje, prebiotikaberikad kost. Dessutom kan vi i vår in vivo modell inte använda för</p>	

stora djur, inte över 250g. Att beställa alltför små råttor antar vi också är ett stressmoment för djuren som vi önskar utesluta. Detta har vi godkända tillägg för i tidigare ansökan C217/6; C296/7.

Till vissa djurs dricksvatten kommer nitrat eller nitrit tillsättas i låga koncentrationer (0,01-1,0 mM) för att utvärdera skyddande NO-effekter vid colit. Denna förbehandling ämnas börjas ges direkt när djuren kommer. För motivering se ovan. Vattnets smak påverkas inte av nitrat eller nitrit och inte heller mängden vatten djuret dricker. Inte heller djurens tillstånd påverkas, nitrat/nitrit tillskott har positiva effekter på magsäckens skyddsmekanismer vilket vi visat tidigare.

Om något djur innan experimenten startar uppvisar tecken på ohälsa såsom stillasittande, gömmer sig, kladdig runt ögon eller nos etc kommer dessa djur att avlivas.

7. Vård och förvaring

Uppgifter skall lämnas dels om djurens vård och förvaring omedelbart före, under och omedelbart efter försöket, dels om vid vilken institution eller klinik förvaringen sker och var försöket skall utföras

Djuren förvaras på BMCs djuravdelning med fastställda rutiner, djurens burar (typ IV-bur max 4/bur) är berikade med trä/papphus och lekpapper. I djurhuset sker probiotika - och prebiotika behandling och nitrat/nitrit förbehandling. Djuren transporteras den korta sträckan mellan djuravdelningen och vårt laboratorium i täckta burar, där de sedan anestেসeras. Vid avslutat försök avlivas djuren utan att ha vaknat ur narkosen.

Vid studier av magslemhinnan sätts vissa av djuren på svält över natt (18 h) med fri tillgång till vatten.

Djuruspersonalen och veterinär har tagit del av ansökan.

8. Djurens situation och försökets slutpunkt

Beskrivning skall göras av den påverkan på djuren som väntas, eventuella komplikationer, smärtupplevelser, beteendeförändringar m.m. Vidare skall motivering för klassificering av försökets svårighetsgrad lämnas (jämför s. 1)

Djuren sövs genom intraperitoneal injektion av anestesimedlet, vilket innebär minimal smärtupplevelse när sövningen utförs av van personal. Djurens anestesidjup kontrolleras kontinuerligt och djuren avlivas under anestesi varför försöket bör klassificeras som ringa svårighetsgrad.

Diarenummer

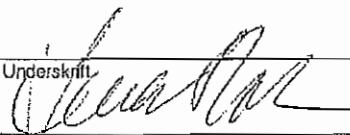
6(7)

9. Anestesi- och avlivningsmetoder

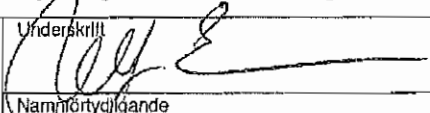
Användning av narkosmedel, bedövningsmedel, smärtlindrande medel och lugnande medel skall anges liksom avlivningsmetod som skall användas

Innan experimenten sövs råttorna med Inactin 120 mg/kg kroppsvikt i.p. (maximal injektionsvolym 0,6 ml) och avlivas under anestesi med en intravenös injektion av mättad kaliumklorid.

Underskrift sökande

Datum	Underskrift
28/9 2009	
	Namnförtydligande
	Lena Holm

Underskrift ansvarig föreståndare enligt 20 § djurskyddslagen har utan erinran tagit del av det planerade djurförsöket

Datum	Underskrift
29/9 2009	
	Namnförtydligande
	Ulf Eriksson

Kompletterande uppgifter till ansökan

OBS! Om nya eller kompletterande uppgifter tillförs under ärendets beredning skall

Dessa antecknas nedan genom beredningsgruppens försorg eller av den djurförsöksetiska nämnden

--

Dnr ... C788/9

KOMPLETTERANDE UPPGIFTER TILL ANSÖKAN

OBS! Om nya eller kompletterande uppgifter manligen tillförs under ärendets beredning skall dessa antecknas nedan genom beredningsgruppens försorg eller av den djurförsöksetiska nämnden.

Ansökan är kompletterad, se bilaga.

BEREDNINGSGRUPPENS FÖRSLAG TILL NÄMNDENS STÄLLNINGSTAGANDE

Datum

Namnunderskrifter och namnförtydliganden

DEN DJURFÖRSÖKSETISKA NÄMNDENS BESLUT

Om inte annat sägs i beslutet gäller detta under tre år från dagen för beslutet

☒ Godkänns

☐ Avslås

☐ Godkänns med följande villkor:

2009-10-23

Datum

C. G. G.

Ordförandens namnunderskrift

Motivering och ev. avvikande mening, se protokollet. I förekommande fall hur man överklagar, se bilaga.

C288/9 ALLMÄN RÄTTA

- Vilka doser ges och hur administreras de?

L-NNA 10 mg/kg i.v bolus i 1 ml följt av en i.v.-infusion 3 mg/kg/h med en infusionshastighet av 1ml/h

L-NIL 10 mg/kg i.v. bolus i 1 ml följt av en i.v.-infusion 3 mg/kg/h med en infusionshastighet av 1ml/h

Diklofenak 5mg/kg i.v. som bolusdos i 1 ml för att hämma prostaglandinsyntesen

Diklofenak 30mg/kg i 0,5ml via gavage 18h innan försöket eller 15mg/kg (0,5ml) och dag i en vecka via gavage för att inducera lätt inflammation i tarmslemhinnan. Dock ingen påverkan på djurens allmäntillstånd.

Nitrat 0,85g/L i dricksvattnet en vecka innan försöket

Omeprazol 40µmol/kg iv i 0,5 ml

- Vid upprepad dosering blir svårighetsgraden måttlig inte ringa.

Du menar att det blir måttlig svårighetsgrad av att vi gavagerar råttorna varje dag i en vecka?

- Behövs så lång svältperiod som 18 h?

Ja för att magsäcken ska vara tom. Annars går det inte att studera slemthjockleken.

- Är KI-mallen tillämpbar och vilken avbrytningspunkt är lämplig?

Ja KI mallen är tillämpbar och vi kontakter alltid vår veterinär om tot refvärdet uppnår 0,3