



# Masteroppgave

Master i atferdsvitenskap

Juni 2021

Antidepressiv effekt av fysisk aktivitet/trening

Artikkel 1: Depresjon og depresjonsbehandling

Artikkel 2: Laktat bidrar til den antidepressive effekten av fysisk  
aktivitet/trening

Emma Karoline Bjørkeng

MALKA5000

30 Studiepoeng

**Fakultet for helsevitenskap**

### Takk

Det er mange jeg ønsker å takke når mitt største arbeid hittil i livet skal leveres og ikke minst vurderes. En stor takk rettes spesielt til min hovedveileder Cecilie Morland, førsteamanuensis ved seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap ved Universitetet i Oslo (UiO) og fakultet for atferdsvitenskap, OsloMet. Takk for at du som veileder under bachelorprosjektet mitt så potensialet i meg og rekrutterte meg til å bli en del av din forskergruppe ved UiO. Jeg er evig takknemlig for muligheten og tilliten du ga meg. Takk for at du alltid har besvart mine spørsmål med den største tålmodighet. Du har alltid vært tilgjengelig og vist interesse for meg og mitt arbeid. Jeg ønsker også å takke for ditt gode humør, selv på tidlige søndagsmorgener i dyrelaben. Takk også til doktorgradsstudent Linda Thøring Øverberg, for din veiledning sammen med Cecilie. Takk for alt du har bidratt med gjennom disse årene og lykke til videre med forskningen din. Det står stor respekt av deg og arbeidet ditt. Til dere begge: jeg håper vi kan fortsette vårt gode samarbeid i fremtiden.

Jeg ønsker også å takke avdelingsleder ved Myrvang bolig og avlastning, og min sjef Britt Nina Østby, som dessverre gikk bort før denne oppgaven var ferdig. Uten hennes tilrettelegging og fleksibilitet i forhold til turnus, hadde jeg ikke hatt muligheten til å gjennomføre masteren ved siden av fulltidsjobben min.

Takk til alle mine gode venner for at dere har lyttet, gitt rom for min frustrasjon og gitt meg mye glede i en ellers hektisk hverdag. Til øvrig familie og mamma og pappa: takk for alle deres motiverende ord og handlinger gjennom alle disse årene med utdanning. Takk for at dere har tatt meg imot med åpne armer og stått der stødige som fjell. Og en spesiell takk for at døren deres alltid er åpen for pass av deres firbente barnebarn, Molly.

Emma Karoline Bjørkeng, juni 2021.

### Sammendrag

Forskning viser at fysisk aktivitet og trening kan motvirke depresjon, men det er fortsatt ukjent hvilke mekanismer som stimulerer til positive endringer i hjernens funksjoner hos deprimerte. Utgangspunktet for denne masteroppgaven er tidligere funn fra forskningsgruppen som viste at laktat reseptoren HCAR1 finnes langs blodårer som forsyner hjernen med blod samt i hjernens ventrikkelsystem. Hjernen tar opp og forbrenner laktat når musklene er i aktivitet, men tilstedeværelsen av en laktatreseptor peker på at laktat også kan ha en signalfunksjon i hjernen. Hypotesen for eksperimentet er at laktat, ved å aktivere HCAR1, bidrar til de positive effektene trening har ved depresjon.

Oppgavens første artikkel er en oversiktsartikkel om depresjon og de behandlingsalternativene som finnes i dag, mens den siste artikkelen er en eksperimentell analyse av trening og depresjon hos mus, hvor det er gjennomført forced swim test (FST) for å finne ut om laktat og forskjellige intensiteter av trening har påvirkning på depresjonssymptomer. I begge artiklene er det arbeidet utfra to forskjellige fagfelt, atferdsanalyse og nevrobiologi, og forsøkt å sammenføre disse. Resultatene fra eksperimentene viser at laktat er den positive effekten trening har ved depresjon.

**Nøkkelord:** Depresjon, HCAR1, FST, forsøksdyr, laktat.

### **Abstract**

Research shows that physical activity and exercise can prevent or reduce depression, but the underlying mechanism are still uncertain. The starting point for this master thesis where previous findings from the researchgroup showing that the lactate receptor HCAR1 is located along bloodvessels that supply the brain, as well as in the ventricular system of the brain. The brain absorbs and burns lactate when the muscles are active, but the presence of HCAR1 on brain cells suggest that lactate may also be a signaling molecule. The hypothesis for the experiment is that lactate, via activation of HCAR1 contributes to the positive effects of exercise on depression.

The first article of the present thesis is a review article about depression and current treatment options, while the second article is an experimental analysis of exercise and depression in mice, where the forced swim test (FST) has been performed to determine whether lactate and different intensities of exercise affects symptoms of depression. Both articles are based on two different disciplines; behavioral analysis and neurobiology; attempting to combine these, the results of the experiments demonstrate that lactate, through activations of HCAR1 contributes to the positive effect of exercise in depression.

**Key words:** Depression, HCAR1, FST, laboratory animals, lactate.

**Innholdsfortegnelse**

Takk .....	1
Sammendrag .....	2
Abstract .....	3

**Artikkel 1: Depresjon og depresjonsbehandling**

Tittel side .....	7
Sammendrag .....	8
Introduksjon .....	8
Behandling av depresjon .....	11
Fysisk aktivitet som behandling mot depresjon og hjerneeffekter .....	13
Videre forskning .....	16
Referanseliste .....	18

**Artikkel 2: Laktat bidrar til den antidepressive effekten av fysisk aktivitet**

Tittel side .....	22
Sammendrag .....	23
Introduksjon .....	23
Metode .....	26
Eksperimentets forarbeid .....	26
Eksperimentets objekter .....	27
Treningsregime .....	28
Gjennomføring av FST .....	29
Analyse av FST .....	31
Vektutvikling .....	32
Datapresentasjon og statistikk .....	32
Resultater .....	32
Diskusjon .....	34
Humane og ikke-humane forsøk .....	35
Bruk av FST for å måle depresjons-atferd .....	36
Hvorfor velge mus som dyremodell? .....	38
Konklusjon .....	38
Referanseliste .....	40
Refleksjonsnotat .....	54
Referanseliste .....	55
Vedlegg .....	56

**Tabeller og figurer****Artikkel 1**

Ingen figurer eller tabeller.

**Artikkel 2**

Tabell 1 .....	44
Tabell 2 .....	45
Tabell 3 .....	47
Figur 1 .....	48
Figur 2 .....	49
Figur 3 .....	50
Figur 4 .....	51
Figur 5 .....	52
Figur 6 .....	53

Artikkel 1: Depresjon og depresjonsbehandling

Article 1: Depression and depression treatment

Emma Karoline Bjørkeng



### **Sammendrag**

Depresjon er en psykisk lidelse som rammer mange mennesker og er en av de vanligste sykdommene på verdensbasis. Depresjon ledsages ofte av andre psykiske lidelser som for eksempel angst. Sykdommen kan behandles med antidepressive legemidler, men en kombinasjon av medikamentell og ikke-medikamentell behandling er vanlig. Fysisk aktivitet/trening har også vist seg å være svært effektiv som behandlingsmetode. Mye av årsaken til de antidepressive effektene av trening er enda ukjent. Det skjer flere endringer i hjernen ved fysisk aktivitet; blant annet økt nydannelse av nerveceller (nevrogenese) som kan bidra til antidepressive effekter. Sammenhengen mellom fysisk aktivitet og depresjon har vært et populært forskningstema de senere årene, og denne artikkelen oppsummerer depresjonsbehandling med og uten legemidler og de viktigste funnene knyttet til antidepressive effekter av trening.

*Nøkkelord:* Atferdsanalytisk forståelse, behandling, depresjon, fysisk aktivitet, trening.

### **Introduksjon**

Rundt 264 millioner mennesker lider av depresjon på verdensbasis (Verdens Helseorganisasjon, 2020). I løpet av livet vil ca. 20 % av alle kvinner og 10 % av alle menn oppleve minst én depressiv episode, og 5 % vil ha kroniske, milde depresjoner. I Norge anslås det at 5 % av befolkningen til enhver tid har depressive plager som påvirker hverdagen (Norsk legemiddelhåndbok, 2019).

I "*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*" 11. utgave (ICD-11) er depresjon klassifisert som en diagnose og delt inn i enkelt episode, tilbakevendende depressiv tilstand og vedvarende affektive tilstander (Verdens Helseorganisasjon, 2019). Hovedsymptomene på depresjon er senket stemningsleie/nedstemthet, minsket energinivå, redusert aktivitetsnivå og liten eller ingen interesse eller glede i ting personen tidligere hadde interesse av. Det er også vanlig med lavere konsentrasjonsevne, dårlig selvfølelse og selvtillit samt negative tanker om fremtiden (Verdens Helseorganisasjon, 2019).

Ved depresjon skjer det en rekke endringer i hjernen. Et av de viktigste funnene er lave nivåer av signalstoffene (nevrotmitterne) serotonin og noradrenalin i deler av hjernen, men man vet ikke om det er en konsekvens av - eller en årsak til sykdommen (Musker & Wong, 2019, s 265). Serotonin og noradrenalin regulerer blant annet stemningsleie og oppmerksomhet, og mange av symptomene ved depresjon er forenelig med et senket nivå av disse signalstoffene. De fleste antidepressive medikamenter virker ved å øke mengden av serotonin og/eller noradrenalin i synapsene mellom nervecellene i hjernen (Musker & Wong, 2019, s 265), noe som tyder på at lave nivåer av disse signalstoffene er en årsak til symptomene. Likevel er det slik at de lave serotonin og/eller noradrenalin nivåene korrigerer raskt etter inntak av legemidler, mens de antidepressive effektene først opptrer etter flere ukers behandling. Dette indikerer at økt serotonin og noradrenalin setter i gang andre prosesser som til slutt leder til hevet stemningsleie hos pasienten. Hva disse mekanismene består i er ikke kjent, men nevrogenese i hippocampus har vært foreslått (Yang et al. 2020, s. 2).

Depresjon er ofte ledsaget av angst (Hagen & Kennair, 2016, s.127). I ICD-11 er depresjon også inndelt i alvorlighetsgradene; mild, moderat og alvorlig. Sistnevnte kan opptre med eller uten psykotiske symptomer. I tillegg skilles det mellom primær depresjon der depresjon tilsynelatende ikke er utløst av andre sykdommer eller tilstander, og sekundær depresjon der de depressive symptomene kommer som følge av annen sykdom. De vanligste årsakene til sekundær depresjon er kardiovaskulære sykdommer som for eksempel hjerteinfarkt eller iskemisk slag, endokrine sykdommer som for eksempel diabetes eller stoffskiftesykdommer, eller nevrologiske sykdommer som for eksempel epilepsi eller primære hodepiner som migrene (Hagen & Kennair, 2016, s.129). Sekundær depresjon omtales ofte som organisk betinget depresjon, etter som den er utløst av organisk sykdom. Depresjon kan forekomme som en del av en bipolar lidelse der pasienten svinger mellom perioder med depresjon og perioder med mani, eller som en unipolar depresjon. Denne artikkelen har fokus på unipolar depresjon, også kalt major depressive disorder (MDD). MDD er en mental

sykdom preget av en utvidet følelse av tristhet og nedstemthet som påvirker tanker og følelser. Det er vanlig å bruke depresjonsskala for selvvurdering ved utredning og diagnostisering av depresjon (Norsk legemiddelhåndbok, 20179).

I følge Myhre & Strømgren (2015) har depresjon fått relativt lite oppmerksomhet i atferdsanalytisk litteratur. Mye av årsaken til dette er at man i atferdsanalyse forholder seg til operasjonaliserbar atferd. De overnevnte symptomene på depresjon, slik som endret stemningsleie, energinivå, konsentrasjonsevne og selvfølelse er hendelser som i atferdsanalysen klassifiseres som indre eller privat atferd (Myhre & Strømgren, 2015, s.80). Atferdsanalyse er opptatt av prediksjon og kontroll og ettersom privat atferd kun er tilgjengelig for observasjon av personen selv vil det være utfordrende å operasjonalisere atferden (Eikeseth & Svartdal, 2013, s. 298). Den medisinske diagnosen depresjon baserer seg i stor grad på egenrapportering fra pasienten ved hjelp av intervju, standardiserte spørreskjema og/eller bruk av stemningsdagbok. De mest brukte er *Mini internasjonalt nevropsykiatrisk intervju (MINI)*, *Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia (Kiddie-SADS-PL)* eller *The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-1)* (Hagen & Kennair, 2016, s.132).

Depresjon er ikke et fagbegrep innenfor atferdsanalyse, men brukes som et samlebegrep på symptomene ved deprimert, privat atferd. I dette fagfeltet blir depresjon forstått som en relasjon mellom atferd og dens omgivelser uten at man som observatør kan henvise til konstruerte strukturer. Operante betingingsprosesser som fører til lav rate av atferd er sentrale i atferdsanalytisk tilnærming til depresjon. Denne tilnærmingen er likevel ikke komplett før man kan redegjøre for de affektive symptomene ved tilstanden som for eksempel nedstemthet. Depresjon forstås med andre ord ikke som et enhetlig fenomen, men mer som en kompleks tilstand med involvering av både respondent/klassisk betingning og operant betingning (Myhre & Strømgren, 2015, s. 81).

Charles Fersters analyser fra 1973 (Ferster, 1973, s. 857) bygger på funksjonelle analyser av atferd opprettholdt av negativ forsterkning og er sentrale i de tidlige studiene av

forsterkningsdeprivasjon. Flere forskere gjennomførte ulike studier som viste at depresjon kjennetegnes ved lav rate av positiv forsterkning og høy rate positiv straff (Ferster, 1973 og Lewinsohn et al, 1980, 1992 og 1993). På bakgrunn av forskernes resultater er det å anta at graden av depresjon korrelerer negativt med raten av positiv forsterkning, altså økt rate forsterkning korrelerer med mindre depresjon. Resultatene fra lignende nyere studier viser det samme (Myhre & Strømgren, 2015 s. 81).

### **Behandling av depresjon**

Depresjon kan være alvorlig og sammensatt, og den medisinske behandlingen tar sikte på å forkorte sykdomsforløpet samt å forhindre symptomer, noe som igjen forebygger både sykehusinnleggelse og selvmord (Hagen & Kennair, 2016).

Samtaleterapi er som oftest førstevalget ved behandling av milde til moderate depresjoner. Når det er snakk om mer alvorlig grad av depresjon kombineres gjerne samtaleterapi med legemidler (Helsenorge, 2018). Det finnes flere typer av samtaleterapi og en av dem er kognitiv terapi, hvor målet er å avdekke pasientens negative tankemønster for å kunne bearbeide disse. Eksempler på dette er interpersonlig terapi hvor det fokuseres på pasientens nære relasjoner, og kan bidra til å styrke relasjonen til familie og venner. Et annet eksempel er problemløsende terapi som fokuserer på spesifikke problemer pasienten sliter med. Ved å se et problem fra flere sider, kan man gjøre tilnærminger for å løse disse tidvis komplekse problemene steg for steg (Helsenorge, 2018). På denne måten kan man endre tankegangen, og pasientene opplever å innhente et mer konstruktivt selvbylde. Det finnes også atferdsanalytiske behandlingsformer som benyttes i depresjonsbehandling, og to av disse baserer seg i stor grad på de samme målene som for kognitiv terapi. Det ene er *Behavioral Activation* (BA). Ved BA ligger det kliniske fokuset på bruken av funksjonelle analyser for å identifisere unngåelses mønstre for deretter å forsøke å erstatte uønsket atferd med alternativ atferd. Atferdsaktivering er et samlebegrep på atferdsorientert behandling av depresjon hvor man fokuserer på samhandling mellom atferd og omgivelsene (Myhre, 2017). Komponenter brukt i BA er selvobservasjon av aktivering, planlegging av aktivitet, mål- og

verdikartlegging, samt sekundære strategier som rollespill. Den andre atferdsanalytiske behandlingsformen er *Brief Behavioral Activation Treatment for Depression* (BATD). BATD baserer seg i stor grad på de samme prinsippene som BA, men innebærer målrettet aktivering som for eksempel å sette pasienten i kontakt med positive forsterkningskontingenser (Myhre & Strømgren, 2015 s. 84). Pasienter med mild til moderat depresjon bør tilbys strukturert psykologisk behandling, enten alene eller i kombinasjon med antidepressiv medikamentell behandling (Hagen & Kennair, 2016, s.133).

Ut fra virkningsmekanismene kan antidepressive legemidler deles inn i følgende fire hovedgrupper: Selektive serotoninreopptakshemmere (SSRI), serotonin- og noradrenalinreopptakshemmere (SNRI), trisykliske antidepressiva og andre antidepressiver. Nerveimpulser overføres fra en nervecelle til en annen ved at signalstoff skilles ut fra den presynaptiske nervecellen (avsenderen), ut i spalten mellom de to cellene (synapsespalten) og binder seg til reseptorer på overflaten til den postsynaptiske cellen (mottakeren). SSRI er den legemiddelgruppen som oftest blir benyttet ved depresjoner og virker ved å blokkerer mekanismen som fører serotonin fra synapsespalten og tilbake til det presynaptiske nevronet. Dermed øker nivået og effekten av serotonin i synapsen (Nordeng & Spigset, 2013, s.218).

Virkningsmekanismen for SNRI ligner på SSRI, men i tillegg til å hemme reopptak av serotonin fra synapsespalten mellom nervecellene i hjernen, hemmer SNRI også reopptak av noradrenalin. SNRI benyttes oftest ved milde til moderate depresjoner (Nordeng & Spigset, 2013, s.218).

Trisykliske antidepressiva (TCA) hemmer reopptak av serotonin og noradrenalin, men også andre neurotransmittere, men på grunn av mindre gunstig bivirkningsprofil blir TCA benyttet like mye som før. Legemiddelgruppen «andre antidepressiver» omfatter blant annet legemidler som hemmer reopptak av noradrenalin og dopamin, og midler som blokkerer enzymet monoaminoksidase. Dette enzymet bryter ned serotonin og noradrenalin. Effekten av slike legemidler er stort sett de samme som for SSRI, nemlig å øke serotonin-signalerings. Denne typen legemidler brukes oftest hos pasienter som enten ikke har hatt effekt av verken

SSRI eller SNRI eller av pasienter som har fått kraftige bivirkninger ved bruken av disse (Nordeng & Spigset, 2013, s.218).

Livsstilsendringer som normalisert døgnrytme, regelmessig inntak av mat og begrenset inntak av rusmidler, herunder alkohol, og regelmessig fysisk aktivitet anbefales ofte ved depresjon. Pasientens egne ønsker for behandling og behandlingsform skal alltid tas i betraktning (Pasient- og brukerrettighetsloven, 2001, § 3-1) og mange vil ha behov for behandling i kombinasjon med andre tiltak, for eksempel yrkesrettede tiltak som er tilrettelegginger på arbeidsplassen. Sosial tilhørighet og identitet er viktige kilder for å motvirke depresjon, og det er gunstig for de aller fleste å beholde yrkesrollen sin (Helsedirektoratet, 2009, s. 35).

Atferdsaktivering har vist seg som en viktig komponent i behandlingen av depresjon, og studier viser at effekten av fysisk aktivitet/trening er relativt stor (Rethrost & Trivedi, 2013, s 204). En studie har vist at fysisk aktivitet tre til fem dager i uken i en periode på mer enn 10 uker ga symptomlindring hos pasientene. I tillegg så man større andel tilbakefall av depresjon hos kontrollgruppen som ikke gjennomførte treningsintervensjonen (Rethrost & Trivedi, 2013, s. 204). På bakgrunn av resultater fra denne og lignende studier er fysisk aktivitet nå inkludert i “The American Psychiatric Association`s” liste over anbefalte behandlingsmetoder (Rethrost & Trivedi, 2013, s. 204).

### **Fysisk aktivitet som behandling mot depresjon og hjerneeffekter**

Fysisk aktivitet defineres som enhver bevegelse kroppen gjør ved hjelp av skjelettmuskulaturen som også resulterer i økt energiforbruk. Dette kan omhandle alt fra arbeid, trening, lek og friluftsliv. Til forskjell fra fysisk aktivitet, defineres trening som systematisk øvelse av både det fysiske og mentale, hvor målet er bedre prestasjonsevne (Bryhn, 2020). Epidemiologiske studier viser at trening, enten det er utholdenhetstrening, styrketrening eller “mind-body exercise” (som for eksempel yoga og pilates), reduserer sjansen for depresjon og kan lindre symptomene dersom en depresjonslidelse oppstår (Kin- Lei et al. 2020, s. 8).

Allerede i 1905 ble den første rapporten som viste positive effekter av moderat fysisk aktivitet på pasienter med dyp depresjon utgitt (Franz & Hamilton, 2006, s. 254). I 1984 ble det vist at løpetrening ga signifikant bedre effekt på depresjon enn ingen behandling hos en gruppe pasienter med lett til moderat depresjon (McCann & Holmes, 1984, s. 1144). Studier som har sammenlignet effekt av trening med effekt av behandling med antidepressive legemidler har funnet at trening kan være like effektivt som legemiddelbehandling (Josefsson et al, 2014; Krogh et al, 2015; Listunova et al, 2018). Fysisk aktivitet/trening som behandling, innebærer dessuten ikke stigma i like stor grad som konvensjonell behandling hos for eksempel en psykolog (Corrigan, 2004, s. 614). Fysisk aktivitet med aerob intensitet har vist moderate, kliniske effekter på symptomer av depresjon, mens styrketrening i enkelte studier har vist større effekt. Dette gjelder begge kjønn (Dinas et al, 2011, s. 320-321).

Fysisk aktivitet nevnes også som behandling i de nasjonale retningslinjene for depresjon hvor det hevdes at ulike former for fysisk aktivitet virker til å ha likeverdig effekt (Helsedirektoratet, 2009, s.36). De nasjonale retningslinjene beskriver de positive effektene av fysisk aktivitet kan skyldes biologiske mekanismer, en opplevelse av mestring, samt en pause fra de depressive tankene og følelsene, sosial interaksjon dersom den fysiske aktiviteten gjennomføres med andre, eller en blanding av disse (Helsedirektoratet, 2009, s.36). For mange pasienter er terskelen for å komme i gang med trening så høy at det å trene (uansett hva og hvordan) må anses å være viktigere enn eksakt treningsintensitet eller treningsform. Noen av symptomene ved depresjon er lite motivasjon og tiltaksløshet, og dermed kan det nok for mange virke uoverkommelig å gjennomføre fysisk aktivitet/trening. Ulleberg & Johannessen (2015) gjennomførte kvalitative dybdeintervju med fysioterapeuter, hvor forskningsspørsmålet omhandlet fysisk aktivitet som behandling for eldre pasienter med depresjonslidelse. Intervjusvarene pekte på at det var vanskelig å motivere deprimerte pasienter til å gjennomføre noen form for fysisk aktivitet, og dersom de lyktes var det store mengder motivasjonsarbeid som lå til grunn (Ulleberg & Johannessen, 2015, s. 39-41).

Forskningen viser tydelig at fysisk aktivitet og trening har effekt ved depresjon, men

man vet ikke med sikkerhet hvor stor rolle treningsintensiteten spiller i så måte. Hjernen kan ta opp og forbrenne laktat fra blodet når musklene er i aktivitet og i studien til Morland et al., (2017) og Lambertus et al i manuskript (2021) viste det seg at de positive effektene var forårsaket av intermitterende økning i laktatnivå. Hos pasienter med depresjon er endringer i hjernens strukturer nøye assosiert med disse delene av nervesystemet: frontal lobe, cingulate gyrus, hippocampus, striatum og ulike hvite strukturer. Reduksjoner i hjernevolum, inkludert strukturelle forandringer i hjernen som tap av nevroner og nedsatt nivå av nevrotrofisk faktor er relatert til depresjon.

Hippocampus er et hjerneområde som er viktig i forbindelse med hukommelse, stress og regulering av stemningsleie. Studier har vist redusert volum i hippocampus og unormal emosjonell regulering hos depressive pasienter, blant annet en fersk metaanalyse av 15 fMRI-baserte studier viste resultatene at depressive pasienter hadde redusert volum i hippocampus (Kin-Lei et al. 2020, s. 5-6). Dyreforsøk har vist at fysisk aktivitet kan motvirke strukturelle endringer i hippocampus som følge av depresjon. Effektene fysisk trening på hjernestrukturene har vist seg positive hos pasienter med depresjon (Kin-Lei et al. 2020, s. 5-6 og Gujral et al. 2017, s.8).

Selv om trening har vist å ha antidepressiv effekt i en rekke studier, vet man ikke alle detaljer om hva det er som gir treningseffekten. Man vet at endorfiner (kroppens lykkehormoner) blant annet kan utløses ved fysisk aktivitet, men i hvilken grad dette bidrar til å utløse treningseffekten i hjernen er ikke kjent. Alle typer endorfiner virker hemmende på ulike aktiviteter i nervesystemet, spesielt aktiviteter forbundet med smerte, angst og ubehag (Nguyen, 2020). Thorèn (1990) viser at intensitet av treningen påvirker produksjon og frisetting av endorfiner, men også av andre nevroaktive stoffer som adrenalin, serotonin og dopamin og denne økte mengden med endorfiner i kroppen har også vist seg å ha blodtrykkssenkende effekt. Hjernederivert nevrotrofisk faktor (BDNF) er et stoff som øker konsentrasjon som respons på fysisk trening (Ieraci et al., 2016) og som påvirker mange prosesser i hjernen. BDNF nivåene i både blod og hjerne øker ved trening, og BDNF påvirker



hjernen på mange måter; for eksempel ved å øke nydannelse av nerveceller og synapser. Nevrogenese i hippocampus er en av de sekundære effektene man ser ved antidepressive legemidler (Ieraci et al., 2016) og en økning i BDNF kan dermed være viktig for den antidepressive effekten av trening. I tråd med dette, er en kjent mutasjon i genet som koder for BDNF (Val66Met genvarianten) foreslått å påvirke hjerneeffekten av trening. I kontroll-mus med normal BDNF gen, fant Ieraci et al., (2016) at trening resulterte i redusert latenstid for fôring samt redusert tid immobil under FST; begge kan tolkes som tegn på redusert depresjonsatferd. I musen med BDNF genvarianten hadde derimot ikke treningen denne effekten. Hippocampal neurogenese var dessuten redusert i mus med BDNF mutasjonen sammenlignet med mus med normal BDNF gen. Dette henger trolig sammen med at musene med BDNF mutasjon hadde lavere basale nivåer av BDNF protein i hippocampus og at BDNF i disse dyrene ikke økte som respons på treningen slik det gjorde i kontroll musene (Ieraci et al, 2016).

Hypotalamus-hypofyse-binyre (HPA) systemet er viktig i stressresponser og påvirker BDNF nivåene i hippocampus. I tråd med dette vant Zheng et al (2006) at 1) trening reverserte de negative effektene av uforutsigbart stress og 2) atferdsforandringene som ble induert av trening og/eller uforutsigbart stress var assosiert med BDNF nivået i hippocampus (Zheng et al., 2006, s. 47).

### **Videre forskning**

Effekten av fysisk aktivitet/trening ved depresjon er godt dokumentert og inngår i dag i terapianbefalingene på nasjonalt nivå. Forskningen tyder på at aktivitet ved veldig lav intensitet er mindre effektive enn trening med moderat intensitet, men hvorvidt trening med høy intensitet er mer effektiv enn trening med moderat intensitet er lite undersøkt. De biologiske mekanismene som setter i gang de antidepressive effektene er også lite kjent. Forskning som kan kaste lys over slike mekanismer, kan i tillegg til å forklare treningseffekter, potensielt identifisere nye angrepspunkter for antidepressive legemidler som

alene eller i kombinasjon med allerede eksisterende terapi, gi nye muligheter for å bedre behandlingen av personer med depresjon.

**Referanseliste**

- Eikeseth, S. & Svartdal, F. (2013). *Anvendt atferdsanalyse - teori og praksis*. Oslo: Gyldendal akademisk.
- Bryhn, R. (2020). Trening. Hentet fra <https://sml.snl.no/trening>
- Corrtigan, P. (2004). How Stigma Interferes With Mental Health Care. *American Psychology*, 59(7), 614-625. Doi: 10.1037/0003-066x.59.7.614
- Dinas, P. C., Koutedakis, Y. & Flouris, A. D. (2011). Effects of exercise and physical activity on depression. *Irish Journal of Medical Science*(180), 319-325. Doi: 10.1007/s11845-010.0633-9
- Ferster, C. B. (1973). A Functional Analysis of Depression. *American Psychology*, 28 (10), 857-870. Hentet fra <https://psycnet-apa-org.ezproxy.oslomet.no/fulltext/1974-11260-001.pdf>
- Franz, S. I. & Hamilton, G. V. (2006). The Effects of Exercise Upon the Retardation in Conditions of Depression. *The American Journal of Psychiatry*, 62(2), 239-256. <https://doi.org/10.1176/ajp.62.2.239>
- Gujral, S., Aizenstein, H., Reynolds, C. F., Butters, M. A. & Ericson, K. I. (2017). Exercise Effects on Depression: Possible Neural Mechanisms. *Gen Hosp Psychiatry*,(49). 2-10. Doi: 10.1016/j.genhosppsy.2017.04.012
- Hagen, R. & Kennair, L. E. O. (2016). Stemningslidelser. I L. E. O. Kennair (Red), *Psykiske lidelser*. (1), s. 122-141). Oslo: Gyldendal Akademisk.
- Helsedirektoratet. (2009). *Nasjonale retningslinjer for diagnostisering og behandling av voksne med depresjon i primær- og spesialisthelsetjenesten*. (15-1561). Hentet fra [https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/voksne-med-depresjon/Voksne%20med%20depresjon%20%E2%80%93%20Nasjonal%20retningslinje%20for%20diagnostisering%20og%20behandling%20i%20prim%C3%A6r-%20og%20spesialisthelsetjenesten.pdf/\\_attachment/inline/ed0d2ef2-da11-4c4e-9423-58e1b6ddc4d9:961cda6577d48345aa0d6fe9642b6b6acc2a6506/Voksne%20med%20d](https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/voksne-med-depresjon/Voksne%20med%20depresjon%20%E2%80%93%20Nasjonal%20retningslinje%20for%20diagnostisering%20og%20behandling%20i%20prim%C3%A6r-%20og%20spesialisthelsetjenesten.pdf/_attachment/inline/ed0d2ef2-da11-4c4e-9423-58e1b6ddc4d9:961cda6577d48345aa0d6fe9642b6b6acc2a6506/Voksne%20med%20d)

[epresjon%20%E2%80%93%20Nasjonal%20retningslinje%20for%20diagnostisering%20og%20behandling%20%20i%20prim%C3%A6r-%20og%20spesialisthelsetjenesten.pdf](#)

Helsenorge. (2018). Depresjon hos voksne. Hentet fra

<https://helsenorge.no/sykdom/psykiske-lidelser/depresjon/depresjon-voksne#Behandling-av-depresjon>

Ieraci, A., Madaio, A. L., Mallai, A., Lee, F.S. & Popoli, M. (2016). Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Human Polymorphism Impairs the Beneficial Exercise-Induced Neurobiological Changes in Mice. *Neuropsychopharmacology*, (41), 3070-3079, Doi: 10.1038/npp.2016.120

Josefsson, T., Lindwall, M. & Archer, T. (2014). Physical exercise interventions in depressive disorders: Meta-analysis and systematic review. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(2), 259-272. Doi:10.1111/sms.12050.

Kin-Lei, Z-, Wan-Ting, J., Xing, X., Zhi-Dong, C., Zu-Hong, L. & Guo-Rong, L. (2020). Exercise, brain plasticity, and depression. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 1-11. Doi: 1111/cns.13385.

Krogh, J., Hjorthøj, C., Speyer, H., Glud, C. & Nordentoft, M. (2015). Exercise of patients with major depression: a protocol for a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ Open*, 7(9), 1-20. Doi: 10.1136/bmjopen-2016-014820

Lambertus, M., Øverberg, L. T., Andersson, K. A., Hjelden, M. S., Hadzic, A., Haugen, Ø. P., ... Morland, C. (2021). L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1. *Scandinavian Physiological Society*, 1-15. DOI: [10.1111/apha.13587](https://doi.org/10.1111/apha.13587)

Lewinsohn, P. M., & Graf, M. (1993). Pleasant activities and depression. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 41(2), 261-268.

<https://doi.org/10.1037/h0035142>

Lewinsohn, P. M., & Libet, J. (1992). Pleasant events, activity schedules and depressions.

- Journal of Abnormal Psychology*, 79(3), 291-295. <https://doi.org/10.1037/h0033207>
- Lewinsohn, P. M., Sullivan, J. M., & Grosscup, S. J. (1980). Changing reinforcing events: An approach to the treatment of depression. *Psychotherapy; Theory, Research & Practice*, 17(3), 322-334. <https://doi.org/10.1037/h0085929>
- Listenova, L., Roth, C., Bartolovic, M., Kienzle, J., Bach, C., Weisbrod, M. & Roesch-Ely, D. (2018). Cognitive Impairment Along the Course of Depression: Non-Pharmacological Treatment Options. *Psychopathology*, 51(5). 295-305. Doi: 10.1159/000492620.
- McCann, I. L. & Holmes, D. S. (1984). Influence of aerobic exercise on depression. *Journal of Personality and Social Psychology*, 46(5). 1142-1147. <https://doi.org.10.1037/0022-3514.46.5.1142>
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., ... Bergersen, L. H. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nature communications* 8(15557), 1-9. Obtained from <https://www.nature.com/articles/ncomms15557.pdf>
- Musker, M. & Wong, Ma-Li. (2019). Treating Depression in the Era of Precision Medicine: Challenges and Perspectives. | Quevedo, J., Carvalho, A. F. & Zarate, C. A. *Neurobiology of Depression*(p. 265 - 275). London: Esevier
- Myhre, M. Ø. (2017). Atferdsaktivering for depresjon. *Tidsskrift for Norsk psykologforening*, 54(5), 466-471. Hentet fra [www.psykologtidsskriftet.no](http://www.psykologtidsskriftet.no)
- Myhre, M. Ø. & Strømgren, B. (2015). Atferdsanalytisk forståelse og behandling av depresjon. *Norsk Tidsskrift for Atferdsanalyse*, 42(2), 79-90. Hentet fra <https://nta.atferd.no/loadfile.aspx?IdFile=1320>
- Nhuyen, T. (2020, 7.mars). *Endorfin*. Store Medisinske leksikon. <https://sml.snl.no/endorfin>
- Norsk legemiddelhåndbok (2019). T5.5 Depresjoner. Hentet fra <https://www.legemiddelhandboka.no/T5.5/Depresjoner>
- Pasient- og brukerrettighetsloven. (2001). Lov om pasient- og brukerrettigheter (LOV-2019-12-20-104). Hentet fra

<https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1999-07-02-63>

- Rethorst, C. D. & Trivedi, M. H. (2013). Evidence-Based Recommendations for the Prescription of Exercise for Major Depressive Disorder. *Journal of Psychiatric Practice*, 19(3), 204-212. Doi:[10.1097/01.pra.0000430504.16952.3e](https://doi.org/10.1097/01.pra.0000430504.16952.3e)
- Spigset, O. (2013). Legemidler ved psykiske sykdommer. I O. Spigset (Red.), *Legemidler og bruken av dem*(2.utgave, s.217-234). Oslo: Gyldendal akademisk.
- Thorèn, P., Floras, J. S., Hoffman, P. & Seals, D. R. (1990). Endorphins and exercise: Physiological mechanisms and clinical implications. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 22(4), 417-428.
- Ulleberg, A. M. & Johannessen, B. (2015). Fysioterapeuters erfaringer med bruk av fysisk aktivitet til eldre deprimerte. *Nordisk Tidsskrift for Helseforskning*, 11(2.), 32-42.  
<https://doi.org/10.7557/14.3711>
- World Health Organization. (2019). ICD-11 for Mortality and Morbidity statistics. Hentet fra <https://icd.who.int/browse11/1-m/en>
- Yang, T., Nie, Z., Shu, H., Kuang, Y., Chen, X., Cheng, J., ... Huiying, L. (2020). The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(82), 1-12, doi: 10.3389/fncel.2020.00082
- Zeng, H., Lio, Y., Li, W., Yang, B., Chen, D., Wang, X., Jiang, Z., Wang, H., Wang, Z., Cornelisson, G. & Halberg, F. (2006). Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 168(1), s. 47-55.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.10.007>

Artikkel 2: Laktat bidrar til den antidepressive effekten av trening

Article 2: Lactate contributes to the antidepressant effect of exercise

Emma Karoline Bjørkeng

### **Sammendrag**

Forskning viser at fysisk aktivitet har fordeler som behandling mot depressive lidelser. Mekanismene som ligger til grunn for de antidepressive effektene av trening er i stor grad ukjent. Økt produksjon av laktat i musklene, og overføring av laktat til blodet og videre til hjernen ved fysisk aktivitet og trening kan spille inn. Laktatbehandling av mus er tidligere vist å ha antidepressiv effekt. Hjernen har en mottaker (reseptor) for laktat; denne kalles hydroksylsyre reseptor 1 (HCAR1). HCAR1 ser ut til å bidra til noen av de positive effektene trening har på hjernen, men om den antidepressive effekten av laktat og trening går via HCAR1, har ikke blitt undersøkt. I denne studien undersøker vi om HCAR1-aktiviering kan bidra til å redusere depresjonsatferd i mus. Ved å sammenligne depresjonsatferd hos mus som har HCAR1 (villtype; wildtype; WT) med mus som mangler genet for denne reseptoren (HCAR1 knock-out; KO). Musene ble eksponert for laktatbehandling eller trening ved ulike intensiteter før depresjonsatferd ble testet i forced swim test (FST). Vi viser at HCAR1 bidrar til den antidepressive effekten av trening.

Funnene åpner for at HCAR1 kan være et mulig angrepspunkt for nye antidepressive legemidler. Videre studier for å avdekke om aktiviering av HCAR1 er en effektiv behandlingsstrategi ved depresjon hos mennesker samt studier for å avdekke biologiske endringer som understøtter de atferdsmessige endringene som vises i denne studien er nødvendige før en endelig konklusjon kan trekkes.

*Nøkkelord:* Depresjon, forced swim test, fysisk aktivitet, HCAR1, laktat.

### **Introduksjon**

Fysisk aktivitet er foreslått å forsinke nevrodegenerative sykdommer som demens, Alzheimers sykdom og depresjon (Nagamatsu et al., 2012, s. 1). Man kjenner en del av de biologiske mekanismene som er involvert i dette, men mye er fortsatt ukjent. Depresjon og antidepressive effekter av fysisk aktivitet og trening er et komplekst fenomen, og psykososiale faktorer interagerer med biologiske endringer som skjer ved fysisk aktivitet og påvirker depresjon. Forskning knyttet til psykososiale faktorer er i stor grad basert på



selvrapporteringskjemaer og observasjon, og dette er mindre utviklet enn den biologiske seksjonen av fagfeltet. Fysisk aktivitet har vist seg å ha en positiv innvirkning på selvtilit og disse effektene oppstår selv i fravær av mer objektive mål på treningseffekter, slik som forbedring av kroppssammensetningen (Kandola et al 2019, s. 529). En brukerundersøkelse i FIRE-stiftelsen peker på at gjennomgående positive effekter kan forklares utfra det atferdsanalytiske begrepet indre motivasjon, herunder følelse av mestring, tilhørighet og deltagelse. Indre motivasjon er viktig for å kunne endre eller opprettholde atferd over tid (Sellereite et al., 2019, s. 47). I atferdsanalyse er man opptatt av prediksjon og atferd som er observerbart. Motivasjon defineres derfor utfra motivasjonelle operasjoner (MO); det vil si miljømessige variabler som enten øker eller reduserer forsterkningseffekten av stimuli, objekter eller hendelser, eller som endrer frekvensen av all atferd som er forsterket eller straffet av samme stimuli, objekt eller hendelse (Cooper et al. 2014, s. 11 og 390). Hvordan dette henger sammen med biologiske endringer, er ikke studert like mye, men man kjenner til en del av de biologiske endringene som ligger til grunn for depresjon, samt hvordan disse påvirkes av trening. Derimot vet man lite om de initiale signaler som setter i gang positive effekter i hjernen ved trening. En hypotese er at musklene skiller ut stoffer som direkte påvirker hjernen under trening.

Musklene frigjør en rekke proteiner (myokiner) når man trener, og disse fungerer som signalbærere til andre deler av kroppen kan påvirke hjernens funksjoner både direkte og indirekte. Et av disse stoffene er laktat som produseres i musklene først og fremst ved hard, anaerob trening. Laktat som frigjøres fra musklene, transporteres med blodet og kan tas opp til hjernen via spesifikke transportører (mono karboksylat transportører, MCTer). I hjernen kan laktat inngå i cellens energimetabolisme. Nyere forskning viser at det også finnes en reseptor i hjernen, som laktat kan binde seg til (HCAR1) og er lokalisert i celler nær blodårer i hjernehinnen Pia mater, samt langs noen større vener og arterier i hjernen (Morland et al., 2017, s. 2). Pia mater er den innerste av de tre hjernehinnene som omhyller hjernen og ryggmargen. Den er meget tynn og sattet festet til hjernens overflate.

Nylig ble det publisert at HCAR1 også finnes i noen deler av hjernens ventrikkelsystem (Hadzic et al., 2020, s. 4). Fysisk aktivitet bedrer hjernens funksjon og kan motvirke både sykdom- og aldringsforandringer i hjernen. Trening øker dessuten dannelsen av små blodårer i hjernen (Ding et al., 2006, s. 15) slik at hjernen får et tettere kapillærnett og bedre blodgjennomstrømming (vaan Praag et al., 2005, s. 8680). Enkelte av disse treningseffektene ser ut til å skyldes effekter av laktat: Laktat øker angiogenese (Álvarez et al., 2014, s. 4769) og denne effekten ser ut til å være regulert av HCAR1 (Morland et al., 2017, s. 5). Laktat er en metabolitt som blir produsert i musklene ved fysisk aktivitet. Laktat ser også ut til å ha antidepressiv effekt: I mus har man funnet at laktatbehandling i 10 dager gjorde musene mindre mottakelige for stress, sosial unngåelse og angst enn mus som ikke fikk behandling (Karnib et al., 2019).

Trening og kanskje spesielt løping har vist seg å øke nydannelse av nerveceller (nevrogenese) i hippocampus, noe som er viktig for hukommelse og læring (Voss et al., 2019, s. 7). Nevrogenese i hippocampus er også viktig for den antidepressive effekten av trening, og kan ligge bak effekten av antidepressive legemidler. Selv om de initiale mekanismene ved antidepressive legemidler er regulering av nivået av neurotransmitteren serotonin, eventuelt også noradrenalin og andre signalstoffer, antar man at langtidseffektene skyldes sekundære mekanismer. Økt nevrogenese er en mulig sekundær effekt som har blitt foreslått å bidra til dette.

Hvorvidt laktat er involvert i å øke nevrogenese i hippocampus er uavklart; studier har funnet at laktat kan øke (Lev-Vachnish et al., 2019, s. 9) eller redusere (Wang et al., 2019, s. 759) nydannelse av nerveceller i dette hjerneområdet. Resultater fra vår forskningsgruppe viser at høyintensiv intervalltrening (som gir økt laktatnivå i blodet) øker nevrogenese i hippocampus, men at dette ikke reguleres av HCAR1. Hvorvidt antidepressive effekter av trening medieres via HCAR1, er ikke kjent.

Denne studien undersøker den positiv innvirkningen trening har på depresjonsatferd, og om det skyldes effekter av laktat via HCARI-aktivering. Vi undersøker videre om fysisk trening ved forskjellig intensitet ga ulik grad av positiv effekt.

## Metode

### Eksperimentets forarbeid

Denne studien ble formelt godkjent av Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem (FOTS ID 12521) og Dyrebruk- og omsorgskomiteen ved Institutt for medisinske basalfag, det medisinske fakultet, Universitet i Oslo. FOTS søknaden inneholdt blant annet beskrivelse av kriterier for å avbryte forsøket for enkelte dyr eller grupper av dyr dersom belastningen for dyret ble større enn det som er nødvendig for å oppnå formålet med forsøket, samt en beskrivelse av hvilken avlivingsmetode som skulle benyttes (Forskrift om bruk av dyr i forsøk, 2015, § 16).

Dyrene ble holdt i egnet levested ved avdeling for Komparativ, medisin Institutt for medisinske basalfag, det medisinske fakultet, Universitet i Oslo. Dyreforsøkene ble utført av Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)-sertifisert personell i streng overensstemmelse med Europa parlamentets direktiv 2010/63/EU av 22. september 2010 om beskyttelse av dyr brukt til vitenskapelig formål.

Denne studien er del av et prosjektet ved Nevrobiologi og toksikologi gruppen ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo (UiO) og er finansiert av Norges Forskningsråd.

Tilvenning av dyrene til håndtering av mennesker, foregikk før og under eksperimentet. Dyrenes velferd ble evaluert ved bruk av et standardisert skåreskjema, som blant annet tok for seg vektutvikling, avmagring, pelskvalitet og stereotyp atferd (tabell 1). Dersom noen av dyrene viste tegn til sykdom eller annen form for ubehag ble de nøye fulgt opp av eksperimentatorene, forskningsansvarlige og dyrepasserne og det ble hele tiden vurdert om dyret var i stand til å fortsette eksperimentet. Utdannede dyrepassere og veterinærer ivaretok dyrenes daglige velferd, mens de som var ansvarlige for eksperimentet passet på dyrenes velferd under selve eksperimentet.

### **Ekperimentets objekter**

Denne studien benyttet mus som forsøksdyr, og det ble brukt to typer mus i forsøkene: villtype-mus (WT) og mus der genet for laktatreseptoren HCAR1 var fjernet (HCAR1 knockout-mus; KO). Forskningsgruppen har tidligere vist at mus naturlig innehar denne laktat reseptoren i hjernen (Lauritzen et al., 2013). De to mustypene hadde samme genetiske bakgrunn med unntak av manglende HCAR1 reseptor hos KO musene. Musene ble øremerket for identifisering ved 4 ukers alder (tabell 2). Biopsien som ble tatt under øremerking ble brukt til genotyping, det vil si bestemmelse av hvilken mus som var WT (har to alleler av gener for HCAR1), KO (mangler HCAR1-gener i begge alleler) eller heterozygot (har et normalt allel for HCAR1 og et allel der HCAR1-genet mangler). Kun WT og KO mus ble brukt i studien. Musene ble oppstallet i greenline bur og hadde 12 timer/12timer lys/mørke syklus. Alle forsøk er gjort i den lyse delen av døgnet (på dagtid fra 09.00 til 14.00). Musene ble oppstallet i grupper på opptil 8 mus per bur og hadde ubegrenset tilgang til mat og drikke. I tillegg til standard strø i bunnen var burene beriket med en trepinne og en dorullkjerne eller et lite plasthus. Etersom denne studien undersøker effekter av trening, ble det ikke satt inn løpehjul i disse burene, selv om det er standard miljøberikelse i forsøksdyravdelingen. Det ble gjennomført tester i tre perioder: august 2018, september 2018 og oktober 2019, disse refereres videre til som henholdsvis eksperiment 1, eksperiment 2 og eksperiment 3.

Ekperiment 1 ble gjennomført på behandlingsnaive mus, altså mus som ikke gjennomgikk noen form for behandling, og ble brukt for å etablere reliabilitet i målingene. Det ble benyttet 19 WT mus (10 hanner; 9 hunner) og 13 KO mus (13 hanner; 0 hunner).

I eksperiment 2, ble WT og KO dyr (8,5-18,5 uker gamle) randomisert til tre behandlingsgrupper (tabell 3). WT kontroll (n=8; 3 hanner, 5 hunner) WT medium intensitets intervalltrening (MIIT: n= 8; 2 hanner, 6 hunner), WT høy intensitets intervalltrening (HIIT: n= 9; 4 hanner, 5 hunner) og KO kontroll (n=7; 2 hanner, 5 hunner), KO MIIT (n= 8; 2 hanner, 6 hunner) og KO HIIT (n=8; 3 hanner, 5 hunner). For treningsintervensjonen, se

nedenfor. En test for maksimal løpskapasitet (Maximal Exercise Capacity Test; MECT) ble gjennomført på dag to av treningen og igjen på dag to av tredje treningsuke (se detaljer for gjennomføring av MECT nedenfor). Forces Swim Test (FST) ble gjennomført etter de første 2 ukene av intervensjonsperioden (prosedyre for FST er beskrevet nedenfor).

I eksperiment 3, ble WT og HCAR1 KO mus randomisert til enten MIIT eller HIIT som ovenfor, 5 dager i uken i 7 uker, eller de fikk intraperitoneal (i.p.) laktatinjeksjoner (2g/kg kroppsvekt; 200mg/ml løst i fysiologisk saltvann; pH = 7,4. Dette tilsvarer 18 mmol laktat per kg kroppsvekt), 5 dager i uken i 7 uker. En kontrollgruppe av sedentære mus fikk injeksjoner med fysiologisk saltvann (samme volum per kg kroppsvekt som laktatinjeksjonene). FST ble gjennomført etter de første 6 ukene av intervensjonsperioden. Fordeling av mus til de ulike treningsgruppene var som følger: WT saltvann (kontroll): n= 16 (6 hanner, 10 hunner), WT MIIT: n= 15 (7 hanner, 8 hunner), WT HIIT: n= 15 (6 hanner, 9 hunner), WT laktat: n= 17 (11 hanner, 6 hunner), KO saltvann (kontroll): n= 16 (9 hanner, 7 hunner), KO MIIT: n= 15 (9 hanner, 6 hunner), KO HIIT: n= 17 (7 hanner, 10 hunner) og KO laktat: n= 16 (7 hanner, 9 hunner).

### **Treningsregime**

Musene trente ved at de løp på tredemølle, 5 dager i uken i enten 2 uker (eksperiment 2) eller 6 uker (eksperiment 3) forkant av FST. Treningen av musene ble gjennomført av andre medlemmer av forskergruppen, men undertegnede var med noen dager som observatør. (tabell 2, bilde 3). Treningsmetoden beskrives derfor ikke i detalj, men hovedtrekkene er som følger: MIIT, HIIT og MECT ble gjennomført på en Exer-3/6 tredemølle fra Columbus Instruments, USA (Morland et al., 2017, s. 6). Denne typen tredemølle er spesialdesignet for trening av rotter og mus, og konstruksjonen er et belte med skillevegger mellom hver bane. Nedenfor beltet som dyrene løp på, var det et rist hvor musene kunne hvilt mellom intervallene dersom de ønsket det (tabell 2, bilde 3). Mus blir lett distraheret av lukten av andre mus, og alle banene ble derfor vasket og desinfisert mellom hvert dyr.

På dag to av treningen, og deretter annenhver uke, ble musenes maksimale løpskapasitet testet via MECT. Testøktene bestod av oppvarming på 15 minutter med en hastighet på 9,6 m/min. Hastigheten ble økt med 1,8 m/min hvert andre minutt frem til utmattelse. Utmattelse ble definert som tidspunkt/hastighet musene nektet å løpe selv om de ble dyttet forsiktig eller løftet tilbake på tredemøllen eller de hadde fått et elektrisk støt. Et lite elektrisk støt med en intensitet på  $< 1,5$  mA ble da gitt via risten nederst i hver løpebane. Det var individuelle brytere for på/av og disse ble bare brukt som siste mulighet før avbrytningskriteriet dersom musene stoppet å løpe. Det ble på forhånd bestemt at det maksimalt kunne gis to elektriske støt til en mus per MECT-økt, men i praksis ble det sjelden benyttet elektriske støt. Testen ble gjennomført uten pauser. Både tiden og hastighet ved utmattelse ble notert av eksperimentator, og plottet fra uke til uke (Microsoft Excel) for å se på progresjonen for hvert enkelt dyr og for de ulike gruppene. Resultatene fra testene ble brukt til å fastsette hastigheten for MIIT/HIIT de neste to ukene av treningen.

Begge treningsprotokollene (MIIT og HIIT) startet med en 10 minutters oppvarming hvor tredemøllen ble satt til en fart på 8 m/min etterfulgt av 10 intervaller av 4 minutter hver med 2 minutters hvile mellom hvert intervall. I hviletiden ble tredemøllen satt til 5 m/min og dyrene kunne velge om de ville ha en aktiv pause eller total hvile. Musene som gjennomførte HIIT løp intervaller på 80 % av deres maksimal kapasitet (begrenset ut fra gjennomsnittlig MECT-resultat for gruppen), mens musene som gjennomførte MIIT løp intervaller på 60 % av deres maksimale kapasitet. Hver økt varte i 68 minutter.

### **Gjennomføring av Forced Swim Test**

FST ble gjennomført på en ukedag hvor musene ikke trente. Før gjennomføringen av testene, ble musene fraktet i burene sine fra oppstallingsrommet (tabell 2) til atferdslaben, hvor de fikk tilvenne seg nytt miljø ved å oppholde seg der i minimum 60 minutter før testingen startet. Grunnen til dette var at musene ikke skulle være påvirket av forflytningen eller miljøskifte under testene.

Oppsettet til FST bestod av tre glassylindere (høyde 40 cm og diameter 17 cm). Disse sylindrene ble fylt med vann (23,8°C) (tabell 3) til 20 cm høyde slik at musene ikke skulle ha mulighet til å støtte halen sin i bunnen av sylinderen under forsøket. Sylindrene med vann ble plassert i en hjemmelaget hylle hvor vegger gjorde det umulig for dyrene å se hverandre under gjennomføringen av testene. Hver forsøksrunde bestod av tre mus, fordelt i hver sin sylinder. Musene ble veid og randomisert til de forskjellige sylindrene, slik at hver runde inneholdt mus som var tilfeldig fordelt fra de ulike behandlingsgruppene og genotypene. Hver mus ble halemerket med enten rød (sylinder 1), grønn (sylinder 2) eller svart (sylinder 3) tusj i et antall ringer som representerte hvilken forsøksrunde musene skulle inngå i. Merkingen sørget for identifisering og gjorde det enklere for eksperimentator å plukke opp riktig mus til riktig runde med minimalt stress for musen.

To rom ble brukt under testingen, og rommene ble adskilt med et forheng. Det ene rommet var for FST gjennomføringen og det andre rommet ble brukt for å oppbevare musene før og etter testene. Testen ble gjennomført av to eksperimentatorer: En person håndterte musene og den andre hadde ansvar for PC og video. For FST-forsøket ble tre mus overført til hver sin sylinder med vann. Et videokamera, koblet til programmet AnyMaze ble startet noen sekunder før første mus ble satt i sylinderen, og forsinkelsen som oppstod mellom plassering av første og siste dyr i sine respektive sylindere ble notert. Umiddelbart etter at alle tre musene var overført til sine respektive sylindere, forlot eksperimentator FST-rommet og begge eksperimentatorene oppholdt seg i PC-rommet hvor også resten av musene ble oppbevart. I dette rommet observerte eksperimentatorene musene under testingen, og kunne når som helst avbryte testen dersom noen av musene hadde vanskeligheter med å holde nesene over vann, eller hadde vanskeligheter med å svømme. Dette ble ikke nødvendig. Filmingen ble avsluttet 6 minutter etter at siste mus ble satt ned i sylinderen. Musene ble da umiddelbart plukket opp, tørket lett med papir og deretter satt i buret sitt under en varmelampe for tørking. Varmelampen var satt slik at den bare lyste på halve buret (tabell 2). Musene kunne dermed selv velge om de ville oppholde seg i den varme eller kjøligere delen av buret. Etter ca. 10

minutter, rett før neste runde med mus var ferdig med FST, ble dyreburene flyttet fra varmelampen. Atferdsrommet hvor testene ble gjennomført, var belyst med indirekte lys og lysstyrken rett over vannoverflaten i sylindrene var på 60-70 lux. Dette ble målt ved forsøksstart og igjen ved avslutning av forsøksdagen. Alle økter ble filmet og filmene ble brukt til analysering.

### **Analyse av FST**

Hver økt varte i 6 minutter, delt inn i en pre-fase definert som de to første minuttene av FST og en eksperimentell fase som bestod av de siste fire minuttene. Pre-fasen ble ikke tatt med i analysen, da musenes atferd i denne fasen først og fremst antas å representere grad av engstelse. Selve testen ble definert som de resterende fire minuttene og var grunnfundamentet for analysene.

Videoopptakene ble automatisk lagret på datamaskinen koblet til videokameraet og i etterkant av hver sesjon ble opptakene overført til eksperimentators minnebrikke. Musenes atferd ble operasjonalisert til to typer: Mobil eller immobil, der immobilitet ble antatt å representere passiv stresshåndtering og/eller fortvilelse som er et kjennetegn ved depresjon. Immobilitet ble definert som perioder der musene ikke gjorde andre bevegelser enn de som var nødvendig for å holde seg flytende med nesene over vannet. Antall sekunder hver mus var immobil ble målt manuelt med stoppeklokke fra videoopptakene. For å unngå forstyrrelser av analysene av parallelle opptak av de andre musene i den samme testen, ble videoen av de andre musene dekket til under analysen. I eksperiment 1 og 2 ble analysene gjort av to uavhengige operatører, som begge var blindet for musenes genotype og behandling. Som tidligere nevnt ble musene i eksperiment 1 brukt for å enes om operasjonaliseringskriterier for den aktuelle atferden og etablere reliabilitet mellom de to eksperimentatorene. Først analyserte hver eksperimentator alle musenes flyttid en gang. Noen dager senere gjennomførte de sammen eksperimentatorene en ny, uavhengig analyse av alle musenes flyttid. Dette for å sikre at eksperimentatorene ikke introduserte nye kriterier for flyt (immobilitet) og svømming (mobilitet) underveis i analysene. Begge sendte så resultatene til



forskningsleder som hadde kodenøkkelen og som beregnet gjennomsnittet av tidene musene var immobile i de fire målingene (to fra hver eksperimentator) for å gi den endelige flyttiden for dyret. Dette dannet grunnlaget for statistiske analyser av forskjeller mellom behandlingsgruppene. Hvis en av målingene skilte seg fra den andre med mer enn 40 %, ble operatøren som utførte målingen bedt om å analysere dyret på nytt.

### **Vektutvikling**

Alle musene ble veid hver uke, og de økte i vekt gjennom forsøket til tross for treningsregimet de gjennomførte. Dette er en indikator på god dyrevelferd i dyrestallen og at behandlingen de gjennomgikk ikke var vesentlig stressende (Figur 1).

### **Datapresentasjon og statistikk**

Data fra FST er presentert som sekunder musene var immobil (av totalt 240 sekunder)  $\pm$  standardfeil (SEM). Vektdata er angitt som gjennomsnittsvikt  $\pm$  SEM for hver behandlingsgruppe. Statistisk analyse er gjort i programmet SPSS. For eksperiment 1, der to grupper ble sammenlignet, er *2-halet, uparet students` t-test* benyttet. For sammenligning av flere grupper (eksperiment 2 og 3), er det gjort one-way ANOVA med LSD posthoc test. Signifikansnivået ble satt til 5 %; altså at  $p < 0,05$  ble ansett som statistisk signifikant.

### **Resultater**

Eksperiment 1 ble først og fremst brukt for å etablere endelige kriterier for immobilitet vs. mobilitet som angitt i metoddelen ovenfor, og deretter undersøke reliabiliteten mellom eksperimentatorene. Flyttiden for HCAR1 KO mus ( $n=13$ ) og WT mus ( $n=19$ ) ble analysert av begge eksperimentatorer. Selv om eksperimentator 1 gjennomgående målte noe høyere grad av immobilitet (84 sekunder hos WT; 91 sekunder hos KO) enn eksperimentator 2 (54 sekunder hos WT; 62 sekunder hos KO), var forholdet mellom gruppene relativt likt: Flyttid i KO var 111 % og 109 % av flyttid i WT for eksperimentator 1 og eksperimentator 2, respektivt. På individnivå var det også slik at dyr som ble skåret høyt av en eksperimentator også ble skåret høyt av den andre. Resultatet viste ingen forskjell mellom genotypene. ( $p=0,48$  for eksperimentator 1 (figur 3) og  $p=0,63$  for eksperimentator 2 (figur 4)). Basert på

disse resultatene ble det besluttet at de videre forsøkene kun skulle bli analysert av eksperimentator 1.

For å undersøke om behandlingen med MIIT eller HIIT påvirket dyrenes atferd i FST, ble WT mus og HCAR1 KO mus randomisert til tre behandlingsgrupper: WT kontroll (n=8), WT MIIT (n=9), WT HIIT (n=9), KO kontroll (n=8), KO MIIT (n=9) og KO HIIT (n=8). Tre forsøksdyr fra WT gruppen ble ekskludert fra analysene fordi de, på to påfølgende treningsdager, presterte markant dårligere enn de tidligere hadde gjort. Disse ble antatt å være syke eller skadet, hvilket på forhånd var satt som avbruddskriterier i studien. I motsetning til eksperiment 1 viser resultatene fra dette eksperimentet at KO kontroll dyrene hadde mindre flyttid ( $84 \pm 16$  sekunder; gjennomsnitt  $\pm$  SEM) enn WT kontrolldyr ( $97 \pm 12$  sekunder; gjennomsnitt  $\pm$  SEM;  $p=0,034$ , one-way ANOVA; LSD post hoc test). Hos WT mus førte både MIIT ( $p=0,002$ ) og HIIT ( $p=0,007$ ) til signifikant mindre flyttid sammenlignet med WT kontrollgruppen. I KO-dyr var det ingen effekt av verken MIIT ( $85 \pm 5$  sekunder;  $p=0,97$ ) eller HIIT ( $64 \pm 15$  sekunder;  $p=0,16$ ) (figur 5).

I eksperiment 3 ble forsøksdyrene delt inn i fire grupper: Kontroll (her saltvanns injeksjoner 5 dager/uke), MIIT, HIIT, men i tillegg en gruppe som fikk laktatinjeksjoner (tabell 1). Behandlingen varte i 6 uker før FST ble gjennomført. Den samme tendensen til at KO saltvann hadde mindre flyttid enn WT saltvann var også her synlig, men det var ikke statistisk signifikant ( $p=0,099$ ). WT MIIT hadde mindre flyttid enn WT kontroll ( $p=0,005$ ). Derimot var det ingen statistisk signifikans mellom WT HIIT og WT kontroll ( $p=0,24$ ). I WT dyr resulterte behandlingen med laktat injeksjonene i mindre flyttid sammenlignet med WT kontroll ( $p=0,01$ ). Hos KO dyrene var det tendens til mindre flyttid hos dyrene eksponert for MIIT, men dette ga ikke statistisk signifikans ( $p=0,068$ ). Det var ingen effekt av verken HIIT eller laktat injeksjoner på flyttid hos KO dyrene. (KO HIIT sammenlignet med KO saltvann:  $p=0,57$ , KO laktat sammenlignet med KO saltvann:  $p=0,32$ ). Det var en sterk tendens til at WT laktat hadde lavere flyttid enn KO laktat ( $p=0,055$ : figur 6).

### Diskusjon

Denne studien viser at aktivering av laktatreseptoren HCAR1, enten via fysisk aktivitet eller via laktatinjeksjoner i to eller seks uker før en depresjonstest, førte til mindre depresjonsatferd i WT dyr. Denne antidepressive effekten av trening/laktat ses kun i WT mus og ikke i KO mus som mangler HCAR1. Depresjonsatferd ble her målt som tid brukt immobil i FST. Videre viser denne studien at to ukers trening, med enten MIIT eller HIIT, effektivt reduserer flyttiden i FST, noe som tolkes som redusert depresjonsatferd i disse dyrene. Etter seks ukers trening ser det derimot ut til at kun MIIT, og ikke HIIT, reduserer depresjonsatferd. I eksperiment 2 og 3 var det dessuten en tydelig tendens til at KO kontroll-mus har mindre flyttid enn WT kontroll mus.

Det at HIIT ser ut til å ha effekt ved to ukers behandling, men ikke ved seks ukers behandling kan være et resultat av at seks ukers høyintensiv trening er for krevende, og øker stressnivået til dyrene. Fra kliniske studier er det anerkjent at tilbakevendende depressive episoder henger sammen med redusert volum av hippocampus. Videre har prekliniske studier har vist at kronisk antidepressiv behandling kan føre til økt nevrogenese i hippocampus. Disse funnene indikerer at redusert nevrogenese i hippocampus er en del av patofysiologien ved depresjon (Jayatissa et al., 2006. s. 2395). Stresshormonet kortisol er for eksempel vist å hemme nevrogenese. I de samme dyrene der FST ble utført, har det også blitt målt nevrogenese. Dyrene ble avlivet en uke etter FST, slik at total behandlingstid i nevrogenese-forsøkene var henholdsvis tre og syv uker. Det ble vist at etter syv ukers behandling økte nevrogenesen i hippocampus med ca. 25 %. Etter tre ukers behandling, fant man en økning på nesten 100 % (Lambertus et al., i manuskript 2021, s. 4). noe som kan tyde på at en stressrespons er involvert. Eventuelt kan man tenke at trening taper sin effektivitet noe over tid. I studiene til Lambertus og medarbeidere var nevrogenese i hippocampus ikke avhengig av HCAR1 aktivering. Dermed kan man vanskelig slutte at den antidepressive effekten av trening hos disse dyrene, som er avhengig av HCAR1, skyldes økt nevrogenese i hippocampus alene. Det ble derimot vist at nevrogenese i en annen nisje, nemlig den

subventrikulære sonen, var avhengig av HCAR1 og økte som respons på trening eller laktat behandling (Lambertus et al., i manuskript, 2021, s. 4). Det er ikke kjent at nevrogenese i denne sonen henger sammen med depresjon.

Ulike treningsstrategier har blitt studert for å finne ut hvilke som er de beste for å opprettholde god helse. I forsøksdyr kan treningen enten foregå med tvang (slik som i denne studien, der operatør bestemte hvor ofte, ved hvilken hastighet og hvor lenge dyrene skulle trene) eller være frivillig (der dyret fritt kan gå av/på treningsapparatet, ofte et løpehjul).. Frivillig fysisk aktivitet/trening kan redusere den negative effekten av stress som påvirke nevrogenese, mens tvungen fysisk aktivitet tidligere har blitt vist å ha høyere effekt til tross for høyere nivå av stress (Hayes et al., 2008, s. 289). I denne studien ønsket vi å undersøke effekten av laktat, og det var derfor nødvendig å sørge for at dyrene trente med høy intensitet. Dette er bakgrunnen for at tvungen trening ble brukt i denne studien.

### **Humane og ikke-humane forsøk**

Modellering av menneskelige depresjons symptomer hos dyr er krevende med bakgrunn i de subjektive, psykologiske og fysiologiske symptomene og mangelen på objektive biomarkører. Gyldighetskriteriene for bruken av dyremodeller i slike forsøk generelt er: 1) at symptomene er representative for menneskelig sykdom, 2) at atferdsforandringer kan observeres objektivt og 3) at atferdsforandringene kan reverseres ved bruk av effektive antidepressive behandlingsmetoder (Mènard et al., 2016, s. 139).

Som ved de fleste dyremodeller skal man være forsiktig med generalisering fra dyreforsøk til mennesker. Nesten alle dyremodeller mimikerer deler av sykdommen, men ikke alle fasetter ved human sykdom. Mènard et al. (2016) konkluderer med at til tross for flere tiår med aktiv forskning med varierte dyremodeller kombinert med vevsprøver fra deprimerte subjekter tatt etter døden, har bare en håndfull nye behandlinger blitt utviklet for alvorlige depresjoner.

### **Bruk av FST for å måle depresjonsatferd**

Testen benyttet i dette eksperimentet er (FST). Dette er en atferdstest utviklet spesielt for gnagere for å evaluere antidepressive legemidler, antidepressive effekt av nye forbindelser eller eksperimentelle manipulasjoner rettet mot å gjengi eller forhindre depresjonslignende tilstander (Yankenvitch-Yahav et al. 2015, p. 1). Porsolt utviklet den opprinnelige versjonen av testen (The Porsolt swim test) på 70-tallet og testen baseres på påstanden om at fluktatferd vil oppstå hos dyr som blir påført aversive, stressende stimuli og at denne atferden vil avta ved depresjon. Opprinnelig var testen ment for rotter, men den har så blitt modifisert og endret til å gjelde mus også.

Dersom flukt ikke er mulig for dyret, vil det til slutt gi opp. Dyrene blir i denne testen plassert i en sylinder fylt med vann, og de fleste dyrene vil prøve å flykte fra dette aversive stimulus. Når musene stanser med det som er å anta er fortvilelse atferd, vil det flyte på vannoverflaten å kun bevege seg nok til å holde nesen over vann (overlevelsesinstinkt). Testen baserer seg på at en høy andel av immobilitet framfor aktiv svømming tilsvarer det man ser hos deprimerte mennesker, og man antar at deprimerte mus vil gi opp raskere og dermed ha lengre flyttid under testene. Testens validitet kan begrunnes i at fysisk eller psykologisk stress som kan indusere depresjon hos dyr er vist å øke den observerte flyttiden. Videre har man sett at behandling med antidepressive legemidler øker tiden dyret bruker på å prøve å flykte. FST var også på tidlig 2000-tallet en populær modell for å teste antidepressive legemidler, både fordi testingen har lave kostnader og fordi det var den mest pålitelige testen tilgjengelig (Petit-Demouliere, Chenu & Bourin, 2004, s. 249). Etter de første FST ble gjennomført på 70-tallet av Porsolt, er mange av parameterne nøye vurdert og endret for å øke blant annet påliteligheten av påvisningen av depressiv atferd gjennom testingen. Flere sensitivitet faktorer er vurdert, blant annet automatiske videoopptak, diameter på sylindren, dybde av vann i sylindren, tiden mellom behandling og FST og temperatur på vannet (Petit-Demouliere et al., 2004, s. 250).

Forskjellige fagfelt har det med å være kritiske til hverandre, og ofte er dette fordi de forskjellige fagfeltene har forskjellige syn på samme fenomen. Et eksempel på dette kan være forsterkning prinsippet i atferdsanalyse som har fått enorm kritikk gjennom tidene, spesielt fra fagfeltet pedagogikk. Flora (2004) ønsket å motbevise myten om at positiv forsterkning minsker den iboende interessen for atferd hos mennesker. Noen mener man vil oppnå motsatt effekt enn det som er ønskelig, ved å benytte positiv forsterkning som belønning. Det blir dermed hevdet at belønning vil ha samme effekt som straff, noe som ut fra de atferdsanalytiske definisjonene av begrepene ikke er mulig. På samme måte er det flere forskere og forfattere som har skrevet kritiske artikler rettet mot bruken av FST som en test av depresjonslignende atferd hos gnagere. Molendijk & Ronald de Kloet (2015) mener at FST ikke kan brukes til noe annet enn det disse testene faktisk viser; en forandring mellom aktiv og passiv atferd i en akutt stressende situasjon og gnagernes underliggende, naturlige atferd og instinkt om overlevelse. Det er flere som retter kritikken til denne atferdstesting fordi det er vanskelig å objektivt definere immobilitet. I denne studien ble immobilitet definert som at dyret ikke gjorde andre bevegelser enn det som var nødvendig for å holde seg flytende.

Sukrose-preferansetest er en alternativ test for måling av depresjonsatferd hos mus. Testen måler i prinsippet anhedoni, en psykisk tilstand som kjennetegnes av manglende glede og lyst. Ved gjennomføringen av sukrose-preferansetest på forsøksmus gir man dyrene valg mellom to flasker. Den ene inneholder sukkervann, mens den andre inneholder vanlig vann. Friske mus vil da foretrekke sukkervannet. Viser testene reduksjon i sukrose-preferanse sammenlignet med kontrollmus, kan dette være en indikasjon på anhedoni. Denne testen måler det foretrukne inntaket av smakspreferansene og har blitt brukt i diettinntaksstudier i flere tiår (Meng-Ying et al., 2018, s. 1686). Fordi glukosetoleransetesten tar mellom 1 og 2 uker å gjennomføre, var det ikke forenlig med resten av forsøket dyrene i denne studien skulle gjennom, inkludert daglig trening. En uke uten trening (for å måle sukrose-preferanse) ville dessuten gjort dataene vanskeligere å tolke, da man ikke hadde visst om effekter av trening ville holde seg i denne perioden. FST ble dermed valg som testmetode fordi det er den mest

brukt testen over lang tid. Den er rask å gjennomføre og lar seg dermed kombinere med forsøksdyrenes treningsregime. Dermed får ikke dyrene opphold mellom trening og forsøk.

Ved arvelige menneskelige sykdommer er dyremodeller vellykket, da det er relativt enkelt å introdusere den samme genfeilen hos dyr å studere effektene av denne. Det er imidlertid vanskelig å modellere psykiatriske sykdommer som MDD hos mus i laboratorier fordi det ofte involverer et sammensatt sykdomsbilde. I tillegg er det problematisk å diagnostisere depresjon hos mus, da ingen tydelige biokjemiske endringer er vist å være diagnostiske markører hos pasientene. I tillegg kan ikke kilden og typen av stressfaktorer i det menneskelige samfunn modelleres for gnagere. I stedet påføres det ofte fysiske belastninger på gnagere i et forsøk på å inducere depresjon. Atferdssymptomene som gnagere viser etter fysiske belastninger, kan være forårsaket eller delvis forårsaket av mindre alvorlige symptomer som er relatert til blant annet søvn.

### **Hvorfor velge mus som dyremodell?**

Mennesket deler imponerende 98,7 % av genene sine med mus. Denne store likheten mellom to ganske forskjellige arter, gjør musene svært verdifulle som dyremodeller for hvordan menneskets gener fungerer. Dersom man fjerner enkeltgener i musemodellene, kan forskere finne ut av hvilke andre funksjoner disse enkeltgenene har (Torheim, 2002), slik det også er gjort i denne studien.

### **Konklusjon**

I denne studien viser vi at trening, via laktat og aktivering av HCAR1, påvirker depresjon hos forsøksdyrene. For å understøtte denne konklusjonen ville det være interessant å kombinere atferds målingene som er presentert i denne oppgaven med biologiske analyser av hjernen til de samme dyrene. Dette er til dels gjort, ved at nevrogenese er undersøkt i de samme dyrene (Lambertus et al., i manuskript, 2021. s. 2), men andre biologiske endringer ville også være av interesse for å understøtte den antidepressive effekten som vises i denne studien. Monoaminhypotesen for depresjon sier at nivåene av enkelte neurotransmittere er lavere i spesielle deler av hjernen hos deprimerte enn friske i normalbefolkningen. Dette

gjelder særlig serotonin, men også noradrenalin og dopamin. I tråd med dette, er de mest brukte legemidlene mot depresjon selektive serotonin reopptakshemmere (SSRI) eller serotonin og noradrenalin reopptakshemmere (SNRI). Det kunne derfor være interessant og undersøkt om protein involvert i serotonin signalering er forandret som respons på trening i mus som har HCA1. Redusert hippocampus-volum og redusert nydannelse av nerveceller i hippocampus er også et kjennetegn ved depresjon, og vanlige antidepressive legemidler påvirker nevrogenese (Micheli et al. 2018. s. 181).



**Referanseliste**

Cooper, J. O., Heron, T. E. & Heward, W. L. (2014). *Applied Behavior Analysis*. (2.utgave).

Upper Saddle River, N,J: Pearson/Merrill Prentice Hall.

Flora, S. R. (2004). *The power of reinforcement*. Albany, NY: State University of New York Press.

Forskrift om bruk av dyr i forsøk. (2015). Forskrift om bruk av dyr i forsøk.

(FOR-2015-06.18-761). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-06-18-761?q=fors%C3%B8ksdyr>

Hayes, K., Sprague, S., Guo, M., Davis, W., Friedman, A., Kumar, A., Kimenes, F. D. &

Ding, Y. (2008). Forced, not voluntary exercise effectively induced neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol*, 115(3), 289-296. doi: [10.1007/s00401-008-0340-z](https://doi.org/10.1007/s00401-008-0340-z)

Jayatissa, M. N., Bisgaard, C., Tingström, A., Papp, M. & Wiborg, O. (2006). Hippocampal

Cytogenesis Correlates to Escitalopram-Mediated Recovery in a Chronic Mild Stress Rat Model of Depression. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2395-2404. DOI: [10.1038/mp.2016.179](https://doi.org/10.1038/mp.2016.179)

Kandola, A., Ashdown-Franks, G., Hendrikse, J., Sabiston, C. M. & Stubbs, B. (2019).

Physical activity and depression: Towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 107, 525-539. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.040>

Karnib, N., El-Ghandour, R., El Hayek, L., Nasrallah, P., Khalifeh, M., Barmo, N.,... Sleiman, S. F. (2019). Lactate is an antidepressant that deviates resilience to stress by modulating the hippocampal levels and activity of histone deacetylases.

- Neuropsychopharmacology*, 44, 1152-1162. Doi:<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0313-z>
- Lambertus, M., Øverberg, L. T., Andersson, K. A., Hjelden, M. S., Hadzic, A., Haugen, Ø. P., ... Morland, C. (2021). L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1. *Scandinavian Physiological Society*, 1-15. DOI: [10.1111/apha.13587](https://doi.org/10.1111/apha.13587)
- Lauritzen, K. H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E. M., Lauritzen, F., Attramadal, H., Storm-Mathisen, J., Gjedde, A. & Bergersen, L. H. (2014). Lactate Receptor Sites Link Neurotransmission, Neurovascular Coupling, and Brain Energy Metabolism. *Cerebral Cortex*, 24(10), 2784-2795.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bht136>
- Lev-Vachnisch, Y. Cadury, S., Rotter-Maskowitz, A., Feldman, N., Roichman, A., Illouz, T., Varvak, A., Nicola, R., Madar, R. & Okun, E. (2019). L-Lactate Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 13(403). 1-13. Doi: [10.3389/fnins.2019.00403](https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00403)
- Mènard, C., Hodes, G. E. & Russo, S. J. (2016). Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience* 321, 138-162. Doi: [10.1016/j.neuroscience.2015.05.053](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.053).
- Meng-Ying, L., Chun-Yu, Y., Li-Juan, Z., Xian-Hui, Z., Chu, X., Hogchan, C., ... Qi-Gang, Z. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Natur protocols*, 13, 1686-1698. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0011-z>
- Micheli, L., Ceccarelli, M., D`Andrea, G. & Tirone, F. (2018). Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull*, 143, 181-193. Doi: [10.1016/j.brainresbull.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.002)
- Molendijk, M. L. & Ronald de Kloet, E. (2015). Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 389-391.

Doi:<http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028>

Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., ...

Bergersen, L. H. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nature communications* 8(15557), 1-9. Obtained from <https://www.nature.com/articles/ncomms15557.pdf>

Nagamatsu, L. S., Handy, T. C., Liang Hsu, C., Voss, M. & Liu-Ambrose, T. (2012).

Resistance training promotes cognitive and functional brain plasticity in seniors with probable mild cognitive impairment: A 6-month randomized controlled trial. *Arch Intern Med*, 172(8): 666–668. Doi:10.1001/archinternmed.2012.379.

Petit-Demouliere, B., Chenu, F. & Bourin, M. (2004). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*. 245-255.

Doi:10.1007/s00213-004-2048-7

Sellereite, I., Haga, M. & Lorås, H. (2019). Fysisk aktivitet som verktøy i det helsefremmende arbeidet opp mot rus og psykisk helse: en brukerundersøkelse i FIRE - stiftelsen Ett skritt videre. *Tidsskrift for psykisk helsearbeid*, 16(1), 39-51.

<https://doi.org/10.18261/issn.1504-3010-2019-01-05>

Torheim, N. (2002, 5.juni). Liten forskjell på mus og menneske. Hentet fra

<https://forskning.no/genteknologi-dna-menneskekroppen/liten-forskjell-pa-mus-og-menneske/1078507>

Voss, M. W., Carmen, S., Yoo, S., Sodoma, M., Vivar, C. & van Praag, H. (2019). Exercise and Hippocampal Memory system. *Trends Cognitive Science*, 23(4), 318-333. Doi: 10.1016/j.tics.2019.01.006

Wang, J., Cui, Y., Yv, Z., Wang, W., Cheng, X., Ji, W., Guo, S., Zhov, Q., Wu, N., Chen, Y., Chen, Y., Song, W., Jiang, M., Wang, Y., Lan, Y., Zhou, B., Mao, L., Li, J., Yanh, H., Guo, W. & Yang, X. (2019). Brain Endothelial Cells Maintain Lactate Homeostasis and Control Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 25(6). 754-767.

<http://doi.org/j.stem.2019.09.009>

Yankenvitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R. (2015). Forced Swim Test as a Model of Depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments* 97(e52587), 1-7. Doi:10.3791/52587

### Tabeller og figurer

*Tabell 1:* Tabellen viser skåringskjema brukt for å evaluere musenes dyrevelferd. En total skåre på mellom 19-18 var å anse som normal, en skåre på mellom 17-15 vise at man måtte følge nøyer med på dyrene, en skåre på mellom 14-10 burde man vurdere avlivning og en skåre på under 9 viste humant endepunkt/avlivning.

Parameters	State	Score	Date	Date	Date	Date	Date	Date
<b>Appearance /hydration status</b>	Normal, normal skin tent and posture	4						
	Slight skin tent present on dorsum	3						
	Moderate skin tent, hunched posture, piloerection present	2						
	Severe skin tent, eyes sunken in, piloerection	1						
<b>Natural behavior</b>	Normal, active in cage prior to and during handling, nesting, sleeping in groups	4						
	Decreased activity, isolated but alert, responsive to handling	3						
	Lethargic, isolated, decrease resistance to handling	2						
	Nonresponsive, move only when touched	1						
<b>Body condition</b>	BC3	3						
	BC2	2						
	BC1	1						
<b>Body weight</b>	Normal	4						
	Loss < 5%	3						
	Loss < 10%	2						
	Loss < 15%	1						
<b>Wound inspection (for 7 days after surgery)</b>	<b>Normal</b> (no exudate, erythema or edema)	4						
	<b>Normal healing</b> (small amount of serous exudate, mild erythema, mild edema)	3						
	<b>Minor wound infection</b> (serous/seropurulent discharge, mild erythema/edema around sutures and wound)	2						
	<b>Moderate wound infection</b> (purulent exudate, moderate erythema/edema around sutures/wound and along wound)	1						
	<b>Severe wound infection</b> (separation of deep tissues, severe erythema/edema purulent exudate)	0						

Tabell 2: Tabellen viser bildene forfatter har tatt gjennom prosjektperioden.

Bilde 1 viser termometeret brukt for å måle temperaturen på vannet som var i sylindrene hvor musene gjennomførte FST.

Bilde 2 viser hvordan musene ble opphold etter FST. I burene sine med varmelampe.

Bilde 3 viser hvordan musene ble trent på tredemølle. En person passet på at musene hele tiden var i aktivitet ved å plassere hånden sin nederst på tredemøllen dersom musene ble passive.

Bilde 4 beskriver øremerkingen av musene.

Bilde 5 viser oppbevaringen av musene på dyrestallen

---

## Bilder

---

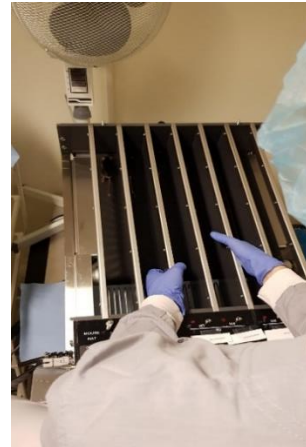
Bilde 1



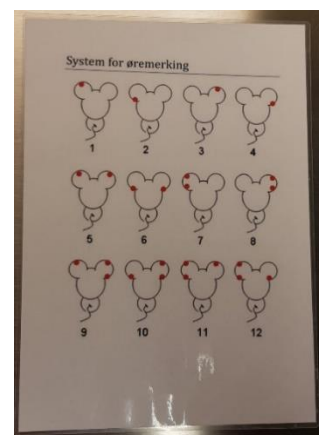
Bilde 2



Bilde 3



Bilde 4



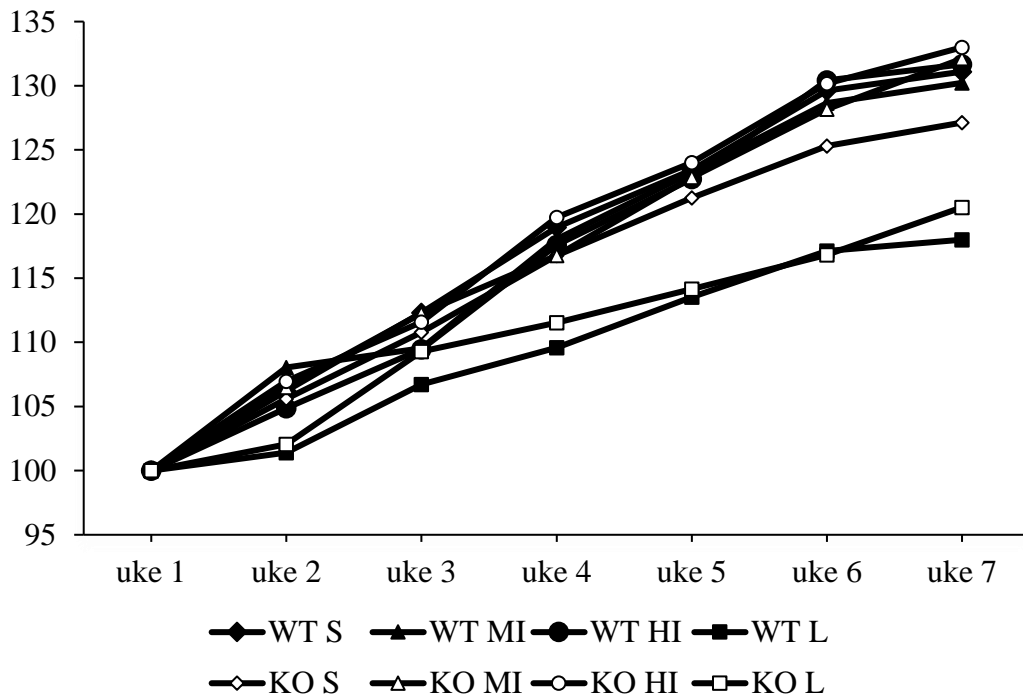
Bilde 5



Tabell 3: Tabellen viser genotypene WT og KO delt inn i 4 grupper og antall forsøksdyr det er i hver gruppe.

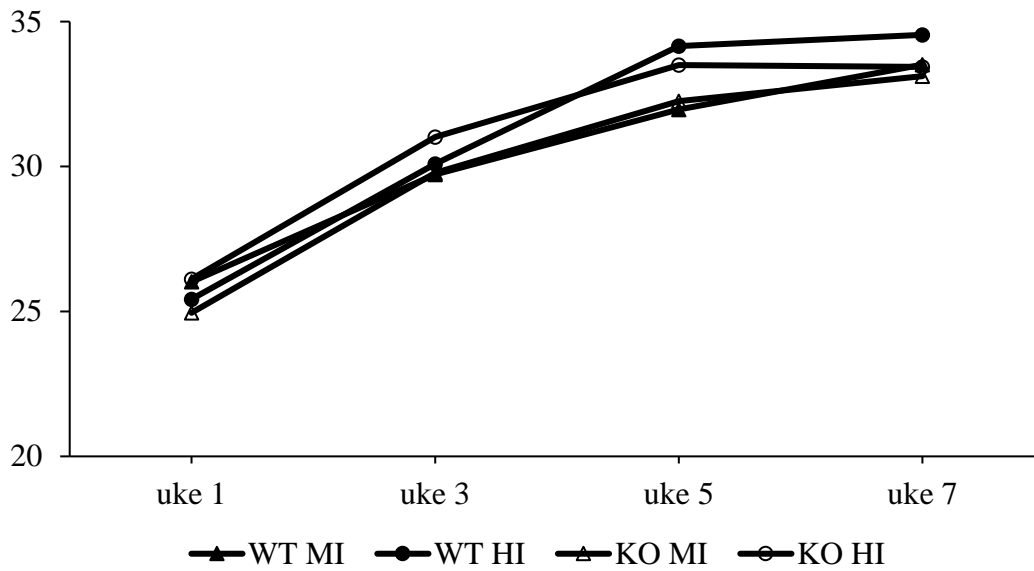
Genotype	Antall
WT saltvann	N=16
WT medium intensitet	N=15
WT høy intensitet	N=15
WT laktat	N=18
KO saltvann	N=20
KO medium intensitet	N=17
KO høy intensitet	N=17
KO laktat	N=18



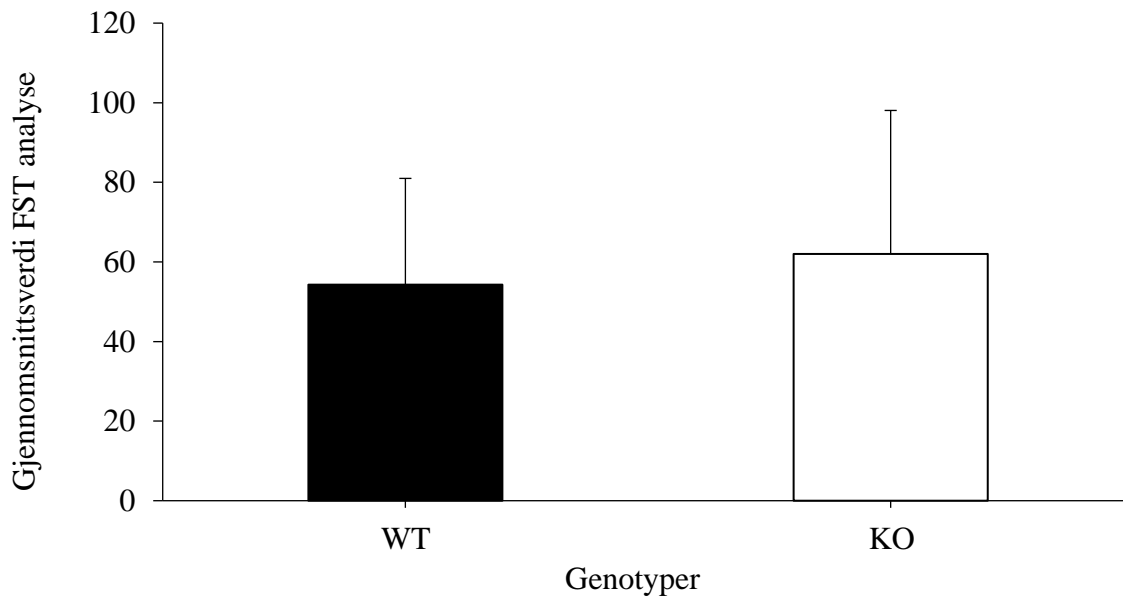


*Figur 1:* Figuren viser gjennomsnittlig vektutviklingen til alle musene. Musene ble veid hver uke, og alle genotypene økte vekten sin gjennom prosjektet, men musene som ble behandlet med HIIT økte sin vekt mindre enn de andre.

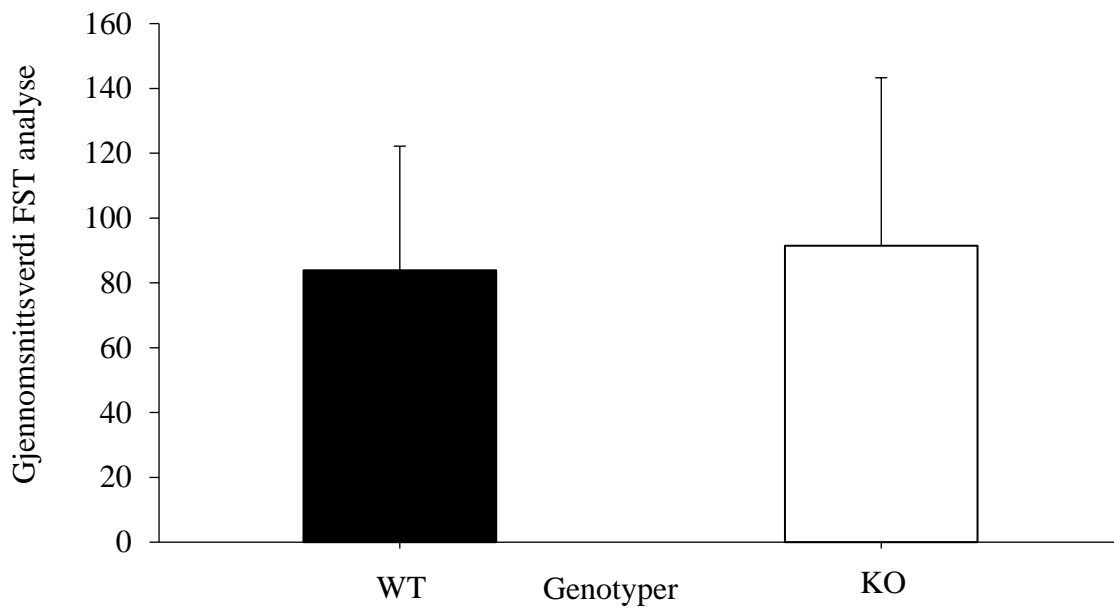
WT S = wildtype saltvann (N= 16), WT MI = wildtype medium intensitet (N= 14), WT HI = wildtype høy intensitet (N= 14), WT L = wildtype laktat (N= 17), KO S = knock-out saltvann (N= 16), KO MI = knock-out medium intensitet (N= 16), KO HI = knock-out høy intensitet (N= 17) og KO L = knock-out laktat (N= 17).



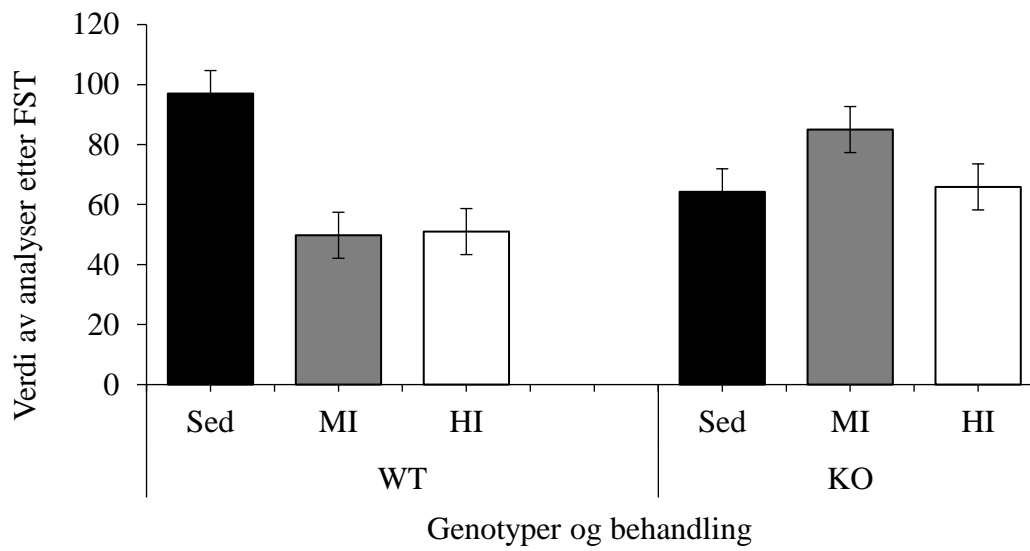
*Figur 2:* Figuren viser gjennomsnittlig løpsutvikling sammenlignet mellom alle genotyper og behandling. N= 58 (WT MI, N=14, WT HI, N=14, KO MI, N= 16 og KO HI, N= 17).



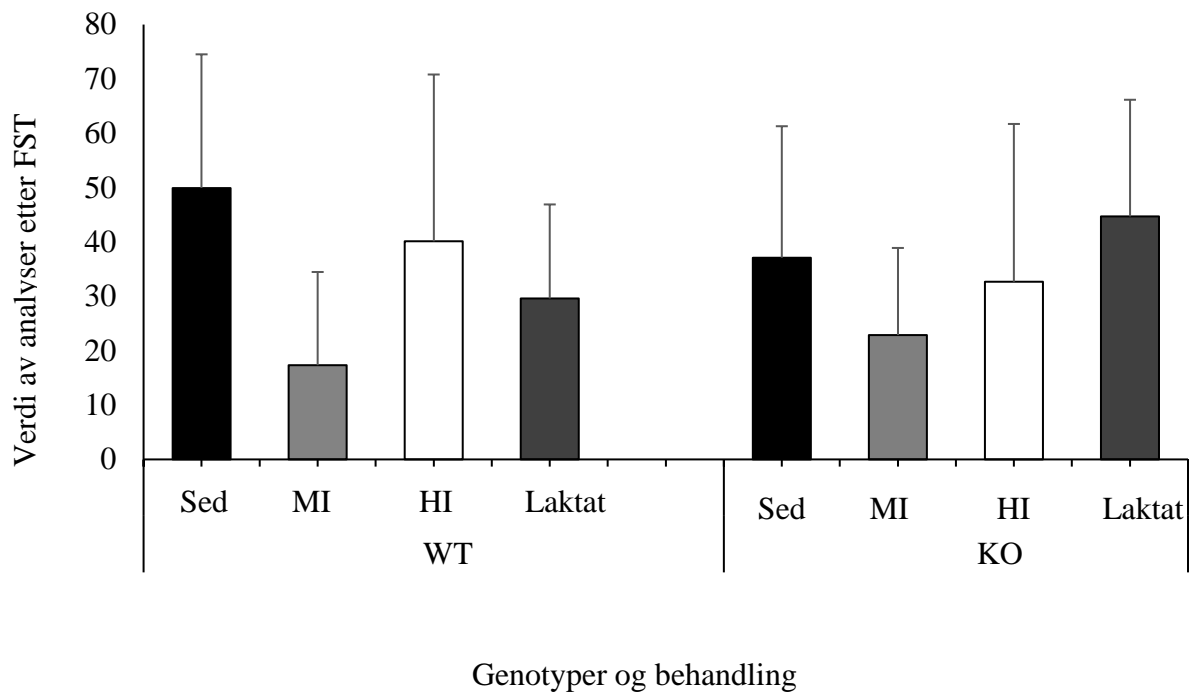
*Figur 3:* Figuren viser eksperimentator 1 sine analyser av FST eksperiment nummer 1.



*Figur 4:* Figuren viser eksperimentator 2 sine analyser av FST eksperiment nummer 1.



*Figur 5:* Denne figuren viser en sammenligning av resultater etter FST, mellom genotyper og behandlingen genotypene gjennomførte.



*Figur 6:* Denne figuren viser en sammenligning av resultater etter FST, mellom genotyper og behandlingen genotypene gjennomførte, pluss kontrollgruppen som fikk laktatinjeksjoner.

### Refleksjonsnotat

Forskrift om bruk av dyr i forsøk (2015) har som formål å bidra til å begrense bruken av forsøksdyr både når formålet er av vitenskapelig- eller utdanningsmessige årsaker. Samtidig skal forskriften fremme god dyrevelferd og respekt for dyrene og hindre at de blir utsatt for unødvendig belastning (Forskrift om bruk av dyr i forsøk, 2015, § 1). Jf. § 4 defineres forsøk som all bruk av dyr enten vitenskapelig-, utdanningsmessige- eller medisinske formål, hvor forsøkene kan påføre dyrene smerte, frykt, varige skader eller annen type belastning som er større enn belastningen dyret ville fått ved et nålestikk hos veterinær med god praksis (Forskrift om bruk av dyr i forsøk, 2015, § 4). Dyr kan kun benyttes i forsøk dersom mattilsynet har godkjent forsøket.

I forkant av dyreforsøket ble det sendt inn søknad til nasjonalt dyreforsøk myndighet, Mattilsynet (se vedlegg 1 og 2). Denne søknaden ble fylt ut med all informasjon om prosjektet og eksperimentenes detaljer og ble elektronisk innsendt til FOTS (*Forsøksdyrforvaltningen tilsyns- og søknadssystem*) jf. forskrift om bruk av dyr i forsøk (2015).

Søknaden beskrev dyrenes belastningsgrad gjennom prosjektet som betydelig krevende hvor dyrene oppnår maksimalt oksygenforbruk ved løping på tredemøllene. Søknaden inneholdt også beregning av antall dyr, hvor søknaden beskrev hvor mange dyr man ønsket å bruke i hvert av eksperimentene. Det ble i denne søknaden også beskrevet hvordan forskningsgruppen hadde tenkt til å etterleve kravene om erstatning, reduksjon og forbedring (Forskrift om bruk av dyr i forsøk, 2015, § 7-8).

**Referanseliste**

Forskrift om bruk av dyr i forsøk. (2015). Forskrift om bruk av dyr i

Forsøk. (FOR-2015-06.18-761). Hentet fra

<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-06-18-761?q=fors%C3%B8ksdyr>



## Vedlegg

### Vedlegg fra FOTS (appendix A)

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

#### Søker og medarbeidere

**Virksomhet 016:** UiO - Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag  
(Domus Medica)

**Adresse** Domus Medica, Sognsvannsveien 9, PB 1112 Blindern  
0316 OSLO

**Telefon** 40673522

**E-post** vet-kpm@basalmed.uio.no

#### Personell med særskilt kontrollansvar

Benedikt Wetzel

Katarzyna Joanna Zelewska

**Fakturaadresse** Universitetet i Oslo, Farmasøytisk biovitenskap, Att: Cecilie Morland;  
Sem Særlandsvei 2C

0371 Oslo

#### Fødselsdato for forsøksansvarlig (for fakturering)

18.01.1977

**Forsøksansvarlig** Cecilie Morland (Kurs i forsøksdyrlære) Medarbeider 1  
Alena Hadzic - Prosjektdeltaker (Kurs i forsøksdyrlære) Medarbeider 2  
Samuel Geiseler - Prosjektdeltaker (Kurs i forsøksdyrlære) **Søknadsdato**  
12.04.2018

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

#### Generelle opplysninger

**Id** 14204

**Saksnummer** 18/7392

**Fakturaref** - - -

**Forsøkets arbeidstittel** lactate sensing fibroblasts in stroke

**Dyreart** - Mus (Mus musculus)

**Virksomhet 016:** UiO - Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag  
(Domus Medica)

**Type søknad** Nytt forsøk

**Belastningsgrad** Betydelig belastende

#### Begrunnelse for belastningsgrad

Part 1.1 of the methods in this project involves the determination of the maximal oxygen consumption of a subgroup of animals, by means of treadmill running. According to the regulations such a test, where an animal is running until exhaustion, is classified as "betydelig belastende".

The remaining experiments would classify as "lett belastende" due to the precautions taken to minimize stress on the animals (see methods).

**Tidligere erfaring med tilsvarende forsøk**

Ja

**Forskningen er finansiert av Forskningsrådet**

**Planlagt start 01.01.2018**

**Planlagt slutt 31.12.2022**

**Forsøkssammendrag, jf forskriften § 8**

Stroke is the most common cause of brain damage, due to the insufficient capacity of the brain to repair ischemia induced neural damage. It has been shown, however, that transient forebrain ischemia leads to neurogenesis, and exercise has been shown to both reduce the likelihood of stroke and the lesion area caused by stroke. The migration and proliferation of neural stem cells into the infarcted area is dependent on growth factors such as vascular-endothelial growth factor (VEGF). We have recently shown that physical activity/exercise promotes angiogenesis in the brain via lactate dependent activation of HCAR1 and subsequent release of VEGF from e.g. pial fibroblast-like cells in the brain. We hypothesize that (part of) the protective effect of exercise in stroke is mediated through HCAR1-dependent release of growth factors from fibroblasts to promote neurogenesis. We will perform exercise regimes and lactate injections prior to induction of stroke in wild type mice and in KO mice lacking the HCAR1. We will then perform behavioral studies of cognitive and motor functions to reveal if knock-out mice that lack HCAR1 develop larger functional loss in response to stroke. We will perform immunohistochemical analysis to reveal whether the lesion area that develops in response to stroke differs between the genotypes, and to analyze alterations in markers for oxidative stress/inflammation and neuroprotection. We will use the minimum amount of animals to achieve statistically valid results. We expect the results to contribute to our understanding of neuroprotection in stroke and to the development of new treatments against the neural damage associated with stroke.

### Offentlighet

**Inneholder søknaden opplysninger som ønskes unntatt fra offentlighet?**

**Hvis ja, angi relevante lover og paragrafer (f. eks. Offentlighetsloven, § 13, 1. avsnitt og Forvaltningsloven, § 13, 1. avsnitt, 2. punkt).**

Nei - - -

**Hvis ja, beskriv hvilke opplysninger som ønskes unntatt fra offentlighet. - - -**

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

### Bakgrunn og hensikt

**Gi en kort presentasjon av bakgrunn og hensikt med forsøket. Angi eventuell hypotese som skal testes. Angi særskilt hvis spesielle lovbestemmelser/krav fra offentlige myndigheter krever at forsøket skal utføres.**

We have recently shown that a lactate receptor, HCAR1, is present and active in the brain. In a follow-up, we demonstrate high levels of HCAR1 on fibroblasts in the meninges, especially in the pia mater. We further show that activation of these receptors, by lactate injections or high-intensity interval exercise, induces angiogenesis through a VEGF-dependent mechanism in the brain of wild type mice but not in HCAR1 knock-out mice. Growth factors like VEGF, FGF2 and IGF-1, all of which can be released from fibroblasts, are important regulators of recovery after ischemia. In particular, the combined action of these growth factors regulates the migration of neuronal stem cells into the ischemic area and their proliferation into functional neurons to rescue brain function. We therefore hypothesize that lactate-sensing fibroblasts of the meninges represent a novel therapeutic and preventive target in stroke, and that this may underlay the beneficial effects of exercise. New evidence suggests that fibroblasts themselves can migrate into the brain parenchyma and differentiate into functional neurons. If lactate released from the ischemic area can initiate HCAR1-dependent neurogenesis, this is a likely protective mechanism in stroke. Through the same mechanisms, activation of HCAR1 by circulating lactate may underlie the beneficial effects of exercise in stroke. The present project will investigate the potential lactate-dependent reprogramming of fibroblasts to neurons, their

HCAR1-dependent release of growth factors, and the impact of these mechanisms in cerebral stroke.

We will expose the mice to high intensity exercise (as we described in the approved FOTS ID 6505), low intensity exercise or lactate injections 5 days a week for 7 weeks. Sub cutaneous lactate treatment was used in the approved FOTS ID 6758, however, based on the experience from this study and a discussion with the local veterinarian, we now wish to inject the lactate intraperitoneal. I.p. injections of lactate have been used in several studies, without causing any problems for the animals. In our previous project, some of the mice experienced lesions in the skin after repeated s.c. injections. This did not occur in control mice injected with NaCl, and is therefore not likely to reflect suboptimal injection technique.

We will compare HCAR1 KO and wt mice, The breeding of these strains are covered by FOTS ID 12521. Subsequently we want to induce transient focal ischemia by occlusion of the medial cerebral artery to simulate stroke in order to investigate the role of exercise-induced activation of HCAR1 in neuroprotection from stroke.

### Beregning av antall dyr

**Gi en begrunnelse for antall forsøksdyr. Ved usikkerhet om populasjonsstørrelse skal det gjennomføres pilotforsøk, jf. forskriftens § 6. Søk hjelp hos statistiker dersom du er i tvil.**

We have extensive experience, working with behavioral tests immunocytochemistry, and western blotting. The number of animals represents, by experience, the lowest number expected to reveal differences in these experiments.

**Gi en oversikt over samtlige forsøksgrupper og gruppestørrelser. Legg gjerne ved en tabell som vedlegg til søknaden.** We need 13 groups of animals:

Experiment 1: Effects of HCAR1 activation in the protection against ischemic brain damage in response to stroke

Group 1: In total 18 HCAR1 KO, high-intensity exercise (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 2: In total 18 wildtype mice, high-intensity exercise, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 3: In total 18 HCAR1 KO, low-intensity exercise (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 4: In total 18 wildtype mice, low-intensity exercise, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 5: In total 18 HCAR1 KO, lactate injections, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 6: In total 18 wildtype mice, lactate injections, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry; Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 7: In total 18 HCAR1 KO mice, NaCl injections, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;

6 for electron microscopy analysis

Group 8: In total 18 wildtype mice, NaCl injections, (Induction of stroke; followed by behavioral analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 9: In total 18 HCAR1 KO mice, NaCl injections (Sham operation; followed by behavioural analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 10: In total 18 wildtype mice, NaCl injections (Sham operation; followed by behavioural analysis). 6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 11: 10 Heterozygote mice (surplus from mating) for system

and procedure validation. Total nr of animals for Experiment 1 =

190 (10 Heterozygote, 90 KO, 90 wt)

Experiment 2: Effects of HCAR1-activation in the acute post-stroke treatment

Group 12: In total 18 HCAR1 KO, (Induction of stroke; Lactate injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for immunohistochemistry;

Group 13: In total 18 wildtype mice, (Induction of stroke; Lactate injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 14: In total 18 HCAR1 KO, (Induction of stroke; NaCl injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 15: In total 18 wildtype mice, (Induction of stroke; NaCl injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for immunohistochemistry;

Group 16: In total 18 HCAR1 KO mice, (Sham operation; NaCl injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Group 17: In total 18 wildtype mice, (Sham operation; NaCl injection at 24 and 48 h, followed by behavioral analysis).  
6 for immunohistochemistry;  
6 for western blotting/biochemistry;  
6 for electron microscopy analysis

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

Total nr of animals for Experiment 2 = 108 (54 KO, 54 wt)

Experiment 3: Local effects of focal ischemia in HCAR1 KO and wildtype, by the use of in vivo 2-photon imaging Group 18: In total 6 HCAR1 KO for insertion of cranial window and 2-photon analysis

Group 19: In total 6 Wild type mice for insertion of cranial

window and 2-photon analysis Total nr of animals for

Experiment 3 = 12 (6 KO, 6 wt)

Total:

Total number of animals for all Experiments: 310 (10 heterozygotes; 150 KO; 150 wt)

Since we will only use homozygous Wild type (+/+) and KO (-/-) animals for the experiments, we will (statistically) need 600 animals.

**Hvilken metode er brukt for beregning av antall dyr.**

Ikke aktuelt

**Hvis "Power analyse"/"Ressursligning": Hvilke input er lagt inn?**

**Hvis "Annen metode": Gi en detaljert beskrivelse av den metoden som er benyttet.**

**Hvis "Ikke aktuelt": Beskriv hvorfor statistiske metoder ikke kan benyttes.**

We have extensive knowledge, working with immunocytochemistry and the amount of animals we are going to use represents, by experience, the least amount to reveal differences in protein expression etc.

### Alternativer/3R

**Erstatning ("replacement"): Hvorfor kan man ikke oppnå forsøkets hensikt uten å benytte levende dyr? Hvilke alternativer er vurdert og hvorfor er de forkastet?**

Investigation of phenotypical changes requires the use of live animals.

**Hvilke databaser ble det søkt i og hvilke søkeord ble benyttet for å finne alternativer?**

not relevant (se below)

**Reduksjon ("reduction"): Når bruk av dyr er uunngåelig: Hvilke tiltak, steg og forholdsregler har du brukt for å minimalisere antall dyr og fremdeles oppnå valide vitenskapelige resultater?**

The number of animals included in this application represents, by experience, the least amount needed to reveal differences in behaviour, morphological changes, protein expression etc.

**Raffinering ("refinement"): Når bruk av dyr er uunngåelig: Hvilke forbedringer av stell og prosedyrer er gjort for å minimalisere smerte, lidelse, ubehag og varig skade og for å øke dyrevelferden i forhold til tidlige lignende forsøk? (Stikkord: anestesi, analgesi, endepunkter, miljøberikelse, operasjonsteknikk, prøvetakningsteknikk osv).** The exercise regime and behavioral tests described in this application are well established in our lab, and are not associated with pain.

Based on previous experiments, we have refined the method for lactate injections, and will now administer lactate i.p. instead of s.c. In previous experiments, s.c. administration of lactate (but not of NaCl) caused some animals to develop skin lesions after some weeks of treatment. This was discussed with the local veterinarian, and we agreed that i.p. injections should be performed. i.p. injections of lactate has been used in many studies, without reports of discomfort and/or pain. The surgery procedures are likely to be painful unless adequate analgesia is provided, and therefore all surgeries will be performed on deeply anesthetized animals, and with additional local anesthetics, as recommended for such procedures. The animals will be under supervision by the

experimenters and/or the animal facility personnel twice a day throughout the experiment. If some animals display pain-related behavior during the experiment period, we will continuously evaluate whether these animal should be withdrawn from the study, and/or need to be euthanized.

## Metodebeskrivelse

### Forberedelsen av dyrene før inngrep:

**For feltforsøk: Beskriv evt. sporing, innfangning, fikseringsmetode, transport osv.**

**For labforsøk: Beskriv evt. innkjøp, transport, karantene/akklimering, oppstalling, miljøberikelse, fôringsregime, merking, veiing osv.**

The animals will be bred in the MDU and kept in standard cages, in light regulated room (12 hours of darkness and 12

hours of light), and with unlimited access to food and water. Ear punch identification will be performed at 4-6 weeks of age and the weight of the mice will be checked regularly.

During Experiments (exercise, injections and/or after stroke iduction), the animals will be weighed weekly.

**Hvilke inngrep (kirurgi, administrasjon av teststoff, merking av viltlevende dyr, fysiske behandlinger m.m.) skal gjøres på dyret under selve forsøket? Legg evt. ved tegninger, protokoller, tidslinjer (aktivitetskart) eller lignende som vedlegg til søknaden.** Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

1)

As already approved for an earlier project (FOTS søknad 6505) we will expose one group of mice to exercise for 7 weeks; 10x4 min intervals, 5 times a week at ~90% of their max. capacity (high intensity training). A second group of mice will receive a low intensity regime, i.e. for 7 weeks, 80min, 5 times a week at 50-60% of their max. capacity.

1.1.)

Training protocol: For the high-intensity training group, each session consists of 10 min warm-up at 5m/min, followed by 10 high-intensity (90% of  $V_o$  max) intervals of 4min each, and separated by 2min of active rest. For the low intensity group, each session consists of 10 min warm-up at 5min/min, followed by 80min of running at low intensity (50% of  $V_o$  max). Running takes place on a treadmill (Columbus Instruments, USA) at a 25 degrees incline (high intensity group) or 0 degrees incline (low intensity group). The mice in the high-intensity group are exposed to the interval exercise protocol for 5 consecutive days each week, for a total duration of 7 weeks. The low intensity group will receive training for 2 days a week separated by 2 days rest for a total duration of 7 weeks. The first day of exercise is used to familiarize the animals to treadmill running. During this session, the animals run on the treadmill at slow speeds (<9.6m/min) until they learn how to run on the treadmill. In case the mice do not run or run on the treadmill with their heads down, they will be pushed gently by handback on the treadmill to make them run, and to do so in the right directions. In our experience the animals learn quickly how to run on the treadmills.

On the second day of the exercise intervention, and then every other week, a maximal exercise-capacity test is performed for each individual mouse, to adjust the running speed of the training intervals to near the maximum they could sustain during 10 consecutive intervals. After a 15min warm-up period at 9.6m/min, the band speed is increased by 1.8m/min every 2min until exhaustion, that is, the mice refuse to run further, despite being manually placed back on to the band or receiving electrical stimuli (intensity <1.5 mA, maximally 1–2 per day by the intrinsic device of the treadmill). This exercise regime has been validated extensively (Wisloff, U., Ellingsen, O. & Kemi, O. J. High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 2009, 37, 139–146 and Chavanelle et al., Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice, *Sci Rep.*, 2017, 7(1):204.). During the exercise regime, the operator learns to know each animal to the extent that we can see if an animal suddenly performs worse than it normally does. In these cases, the animal is presumed to be sick, injured or tired, and allowed short additional breaks. If necessary, the animal will be allowed to rest until the next day. Should an animal perform below expectations for more than three consecutive days, the animal is presumed injured, and will be redrawn from the study. In our previous experiments, we have never had to exclude animals for the cause of injuries.

Judgement of withdrawal and/or euthanization of single animals will be continuously be discussed with the local veterinarian. The same goes if individual animals should lose weight, show stereotypical behaviours or other signs of distress.

2)

As already approved for an earlier project (FOTS søknad 6758), for a third group, we will give a subcutaneous lactate or saline injection once a day, five days a week, for 8 weeks. The lactate treated mice will receive 2 g/kg of sodium lactate dissolved in phosphate buffered saline, at concentration of 200 mg/mL (~ 18 mM, pH 7.4). Controls will be injected with phosphate buffered saline at the same volume/kg bodyweight.

3)

The 3 groups described above will then be subjected to receive a "permanent coagulation of the distal middle cerebral artery" (pCDMCA) according to Ilovera et al. 2014 (J Vis Exp. 2014 Jul 31;(89):e51729. doi: 10.3791/51729. Modeling stroke in mice: permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. Ilovera G, Roth S, Plesnila N, Veltkamp R, Liesz A.). Some animal will receive a sham operation instead, as described in the section for the calculation of animal groups.

The detailed description of this method is as follows:

3.1.)

Preparation of the Material and Instruments

Connect the heat blanket in order to maintain the operation area warm and maintain the mouse body temperature during anesthesia (37 °C).

Prepare autoclaved scissors, forceps and cottons, dexpanthenol eye ointment and suture material. Prepare a syringe with saline solution (without needle) to maintain the operation area hydrated. Prepare the anesthesia gas (70% N<sub>2</sub>O + 30% O<sub>2</sub> + isoflurane).

Inject analgesics SQ: Metamizol 200 mg/kg, Carprofen 4 mg/kg and Buprenorphin 0.1 mg/kg. Place the mouse into the induction chamber with an isoflurane flow rate of 4% to anesthetize it until spontaneous movement of body and vibrissae stops.

Transfer the mouse in lateral position with its nose into the anesthesia mask and maintain isoflurane concentration at 4% for approximately another minute, then reduce and it at approx. 1.5% to maintain appropriate anesthesia.

Apply dexpanthenol eye ointment on both eyes.

3.2.)

Distal MCAO Model:

Make a 1 cm skin incision between the ear and eye using little operation scissors after aseptical preparation of Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke the surgical site using skin disinfectant.

Separate the skin and localize the temporal muscle.

Select in the high frequency generator the coagulation function, bipolar mode, select 12 W and connect the electrocoagulation forceps with the cable.

Add a drop of saline and use the forceps to detach the temporal muscle from the skull in its apical and dorsal part, thereby, making a muscle flap without totally removing the muscle.

Identify the MCA below the transparent skull, in the rostral part of the temporal area, dorsal to the retro-orbital sinus. If the MCA bifurcation is not visible (due to an anatomical normal variation) identify the vessel most rostral. Add some saline on the skull and thin out the bone with the drill right above the MCA branch until it has a thin and translucent texture.

Carefully withdraw the bone above the artery with a very thin forceps.

Select bipolar mode in the high frequency generator at 7 W. Coagulate the artery with the electrocoagulation forceps proximal and distal to the bifurcation. When the bifurcation is not visible due to an anatomical variant, coagulate the correctly identified MCA branch (see above) at two sites of approx. 1mm distance. It is not necessary to grasp the artery with the forceps for coagulation, touching the artery carefully with the forceps on both sides from above is sufficient and induces less mechanical damage. Wait 30 sec and gently touch the artery with a blunted forceps to check for any blood flow due to spontaneous recanalization. In case of recanalization repeat the electrocoagulation once.

Relocate the temporal muscle to its position, covering the burr hole.

Suture the wound and place the animal in a nursing box at 32 °C to recover from anesthesia and return it to the cage. In general it takes 5-10 min for the animal to recover from anesthesia.

Inject postoperative analgesia (SQ) after 24 hr and then daily until the fifth postoperative day: Carprofen 4 mg/kg.



#### Sham Operation

Perform all procedures identically to the operation described above – including thinning of the skull and its removal – except for not coagulating the exposed artery.

#### 4.)

Behavioural testing:

##### 4.1.)

**MotoRater:** One day prior to the test, the mice will be anesthetised (isoflurane) and the hair on the legs and hips will be shaved. A small mark will be applied to the skin with water proof ink in contrast colour. This procedure will take only ca. 5 min per animal and involves no pain. The animal will be placed in a heated chamber to recover from anaesthesia before it is taken back to its cage.

For the test itself, the mouse will be taken from its home-cage into a fresh cage. The home-cage will be placed on the exit side of the runway in the MotoRater. The runway consists of a 5x100cm Plexiglas plate with 10cm high walls on each side. The animal will be placed at the entrance side and will walk towards its home-cage where it is free to enter. This process will be filmed. The process will be repeated 5 times. No training is required. In case an animal shows signs of distress such as excessive struggling, increased respiration rate, and repetitive motions that reflect discomfort, it will be taken back to its homecage.

##### 4.2.)

**RotaRod:** Mice are acclimated to the rota-rod (Harvard Apparatus, Panlab, Spain), turning at four rotations per minute for 5min on the first day of testing, prior to data acquisition.

The testing schedule consists of five trials that are 300sec in length on day one; followed by two trials on each subsequent testing day. Animals are returned to their home cage for 45min between every trial. At the beginning of each trial, the rota-rod rotates at a speed of four rotations per minute and gradually increases to a maximum speed of 40 rotations per minute over the 300sec trial. During the training trials (everyone but the last two trials), the mice will gently be placed back on the rod when they fall off. At the testing day (last two trials), the latency to fall of the rod is noted, and the animal is not placed back on the rod. If a subject holds on to the rod for a full rotation, the trial for that subject is ended and their latency to fall is recorded at that time point. This method is well established and widely used (e.g. Lamon & Weber, *Behav Brain Res.* 2015 Jun 1;286:11-6) and poses minimal stress and no risk for injury/pain. In case an animal shows signs of distress such as excessive struggling, increased respiration rate, and repetitive motions that reflect discomfort, it will be taken back to its homecage.

##### 4.3.)

**Forced-swim test:** To facilitate adaptation to novel surroundings, mice will be transported to the testing area from the animal colony at least 1 h prior to testing. Swim sessions will be conducted by placing mice in individual glass cylinders (46 cm tall x 21 cm in diameter) filled with water (23–25°C water) to a depth of 15 cm. Mice will be placed individually in the glass cylinder. A standard 15-min test duration will be employed for behavioral scoring. After swimming, the mice will be removed from the water, dried with a towel and returned to their homecage. The water will be changed between subjects. All test sessions are recorded by a video camera positioned directly above the cylinders. This method is a widely used standard method used for behavioural testing for depression (e.g. Slattery & Cryan, *Nat Protoc.* 2012 May 3;7(6):1009-14).

In case an animal shows signs of distress such as inability to swim, excessive struggling, increased respiration rate, and repetitive motions that reflect discomfort, it will be taken back to its homecage.

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

#### 5.)

**2-Photon imaging.** This method is based on the approved FOTS søknad 7480 and will be performed in collaboration with the Vervaeke group.

##### 5.1.)

**Head post surgery:** The purpose of this procedure is to attach a headpost (small titanium bar) to the mouse skull to hold the animal's head. Standard sterile surgery procedures are used. Animals are anesthetized with isoflurane (Inhalation; Induction 4 %, maintenance 1.5 %). Following deep anesthesia, a flap of skin approximately 1cm squared



covering the skull is removed. Marcain (a lidocain) is applied to the wound margins for topical analgesic. A custom-built titanium bar (10 x 2 mm) is cemented to the animal's head using dental acrylic. Using a dental drill with an FG 1/4 drill bit, a small hole is drilled into the skull. To introduce the virus (and/or tracer) with minimal damage we use a fine injection pipette (tip diameter ~5- 10 microns; beveled). A pipette containing virus (and/or tracer) is lowered into the brain region of interest. Approximately 10 nL of viral suspension is injected slowly (1 minute). Following the surgery Buprenorphine (0.1mg/kg, subcutaneous) is administered once. Ketoprofen (5mg/kg, subcutaneous) is administered for two days to reduce inflammation.

### 5.2.)

Chronic imaging window: The purpose of this procedure is to provide access for imaging of the neocortex by means of a small imaging window and to implant a small titanium frame to hold the animal's head. Standard sterile surgery procedures are used. Animals are anesthetized with isoflurane (4 % induction, 1.5 % maintenance). Corticosteroids (Dexamethasone, 2mg/kg, subcutaneous) are administered shortly after the onset of anesthesia to reduce swelling of the tissue around the surgical area. Following deep anesthesia, a flap of skin approximately 1cm squared covering the skull is removed. Liquid marcaine is applied to the wound margins for topical anesthesia. Using a dental drill with an FG 1/4 drill bit, a 2.5 mm squared region of the skull overlying one hemisphere of the brain is removed, exposing the underlying brain. Saturated gel foam is used to control any bleeding from the dura and wound margins. An optical chamber is then constructed by placing either a glass cover slip or a biocompatible silicone elastomer (Kwik-Sil) over the craniotomy, and sealing it in place with dental acrylic. All wound margins are sealed with dental acrylic, preventing infection of the wound. Additionally, a custom built titanium frame (10 x 10 x 1 mm, weight: 400 mg) with tapped screw holes is cemented to the animal's head using dental acrylic. After the surgery buprenorphine (0.1mg/kg, subcutaneous) is administered to treat pain. Ketoprofen (5mg/kg, subcutaneous) is administered for two days to reduce inflammation. Each day following the surgery animals are examined for infection, damage to the optical chamber, weight loss, and lethargy.

### 5.3.)

Head-fixed recordings: For recording experiments, the subject is immobilized by placing the head-post in a custom mount, with the subject standing comfortably with natural posture. Recordings include Ca imaging of population activity and standard 2-photon microscopy to study morphological changes in the neural tissue. The custom mount consists of a clamp matched to the shape of the headpost at one end, and firmly affixed to the floor of the recording chamber on the other. The subject will be monitored continually while in the restraint. Imaging and stimulation experiments will not begin until the animal is well acclimatized to the restraint. A well-acclimatized animal is relaxed and shows no signs of distress or struggling in the restraint, and will often even fall asleep. Acclimatization is achieved by placing the animal into the restraint for progressively longer periods over one or several days, until the animal no longer shows signs of distress. Recording sessions may last up to 4 hours, but will be terminated if a subject shows obvious signs of physical distress. Signs of physical distress include struggling, increased respiration rate, and repetitive motions that reflect focal discomfort. No more than two recordings sessions per day will be performed, with at least 30 minutes between them, during which the animal may eat and drink.

#### **Hvilke registreringer skal gjøres og hvilke prøver skal tas i løpet av forsøket?**

No samples will be taken during the experiments.

The animals of group 1-17 will be subjected to behavioural testing. We will perform a MotoRater test for gate analysis and a RotaRod test for general motoric control and a force swimming test for depression.

The motor cortex of the animals with the cranial window operation (group 18-19) will be imaged twice a week for 7 weeks with a 2-photon microscope.

#### **Angi oppfølging og overvåkning av dyrene under hele forsøket (før, under og etter aktuelle inngrep). Legg gjerne ved relevant scoringsskjema:**

The animals will be checked every day by the staff from the Department of comparative medicine. One week before and during the experiment the animals will be handled by the experimenters to familiarize them to the handling procedures. During an experiment, mice are always weighed to make sure they have a steady body

weight. We will also check the fur to make sure that it's smooth and not ruffled. If some animals display signs of disease or distress during the experiment period, they will be closely followed up by the experimental staff to determine whether extra care/treatment is needed (see below).

See attached file for the detailed scoring to evaluate pain and definition of human endpoint.

**Dersom dyr skal avlives:** Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

**Hvilken avlivingsmetode skal benyttes (jf. forskriften § 16, 2. ledd og vedlegg C)?**

The animals that will undergo perfusion will be anesthetized with Zolazepam 3.3 mg, Tiletamine 3.3 mg, Xylazine 0.5 mg, Fentanyl 2.6 microg per ml.

Dosing: 0,1 ml/10 g IP

Mice will get 10-15 min for anesthesia to have effect before reflex examination.

Under deep anesthesia (total absence of pain responses) the thorax will be opened and a cannula inserted into the left ventricle. A buffer containing aldehydes (fixative solution) will be pumped through the cannula into the circulation, using a peristaltic pump, at a rate corresponding to normal cardiac output of mice. The right atrium is opened, so that pressure in the circulatory system is avoided. The perfusion time will be 10 min. Zoletil Forte, 3,4 ml Rompun, 8 ml Fentanyl og 129,4 ml sterile saline solution.

Animals for Western and qPCR analysis will be euthanized by cervical dislocation and decapitated.

**Dersom det skal benyttes annen avlivingsmetode enn angitt i vedlegg C:**

**Beskriv valgte avlivingsmetode.**

-

**Begrunnelse for valg av annen avlivingsmetode (jf. forskriften § 16, 3. ledd)**

-

**Angi kriterier for humane endepunkter (dvs. kriterier for å avbryte forsøket for det enkelte dyr/grupper av dyr fordi belastningen for dyret er større enn det som er nødvendig for å oppnå formålet med forsøket).** These experiments are NOT likely to induce pain or stress in the animals, but some animals might experience some distress in response to the injections itself (not related to the lactate dose) or the other operation procedures described above.

Despite this, should an animal display serious signs of distress or disease, like fur changes, altered behaviour or other signs of distress (from other causes than the actual experiment) it will be euthanized by cervical dislocation and decapitated.

We will weigh the animals weekly, however in these experiments, weight loss is not likely to be the end-point criterion, since we will euthanize the animals based on signs of reduced general status of health/ reduced activity. Such changes normally occur at an early state, before the animals will develop pathological weight changes. See attached scoring procedure for details.

**Hvilke tiltak vil bli aktuelt å iverksette hvis dyrene når humant endepunkt (f. eks. behandling av symptomer, redusere eksponering, avliving)?**

If an animal displays serious signs of distress or disease, it will be euthanized by cervical dislocation and decapitated. See attached scoring procedure for details.

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

## Forsøksdyr (art, medikamentbruk og smertevurdering)

**Dyreart** - Mus (Mus musculus)

**Linje/Stamme** GPR81 (HCAR1)

**Kjønn** Begge

**Antall** 600

**Vekt ved oppstart** - - -

**Vekt ved avslutning** - - -

**Alder** > 10 weeks

**Antall dyr ved gjenbruk (jf. § 17)**

Gjenbruk er ikke relevant **Erfaring med denne dyreart** Ja

**Beskriv fordeling av antall dyr i forhold til kjønn, vekt og alder**

**Varighet av hele forsøket for det enkelte dyr (d, t, min).**

- - -

59,0,0

**Dyr med en avvikende fenotype (se prinsipputtalelse).**

Har dyrene arvelig sykdom/lidelse som kan påvirke deres velferd (eksempler: diabetes, autoimmun sykdom, økt forekomst av tumor, lidelser i bevegelsesapparatet, tanndefekter m.m.)?  
- - -

Slike lidelser er ikke kjent/beskrevet i  litteraturen

Hvilke tiltak/behandling skal iverksettes for å sikre velferden for dyr med arvelig/medfødt sykdom/lidelse nevnt over, og når regner du med at det blir nødvendig?  
- - -

Slike tiltak vil ikke bli nødvendig

**Sedasjon, analgesi og anestesi**

**Angi medikament (produktnavn og generisk navn), dose og evt. vedlikeholdsdose, administrasjonsmåte og tidspunkt(er) og evt. administrasjonsperiode**

Group 1-9 (see below): Prior to surgery, the animals will be anesthetized with Isoflurane (1.5-2%). Maintenance of anesthesia during surgery with 1-1.5% Isoflurane in 2/3N<sub>2</sub>O and 1/3 O<sub>2</sub>.

In addition, local application of Lidocaine gel for pain relief.

Group 10-13 (see below): Prior to surgery, the animals will be anesthetized with Isoflurane (1.5-2%). Maintenance of anesthesia during surgery with 1-1.5% isoflurane in 2/3N<sub>2</sub>O and 1/3 O<sub>2</sub>.

application (subcutaneous) of Dexamethasone (0.2mg/Kg) and Carprofen (5mg/Kg) to prevent brain swelling and/ or inflammation.

In addition, local application of lidocaine gel for pain relief.

All animals: Prior to transcatheter perfusion, the animals will be anesthetized deeply with Zolazepam 3.3 mg, Tiletamine 3.3 mg, Xylazine 0.5 mg, Fentanyl 2.6 microg per ml.

Det vil bli benyttet legemiddel/-er som  helt eller delvis hindrer dyret i å gi uttrykk for smerte, f. eks. neuromuskulære blokkere

Gi en nærmere beskrivelse av bedøvelsen eller smertebehandlingen som skal benyttes i forbindelse med bruk av slike midler  
-

Forsøket innebærer smerte, men  analgesi må utelates

Begrunnelse for at analgesi unnlates  
-

**Begrunnelse for valg av dyremodell**

**Gi en begrunnelse for valg av dyremodell, jf. forskriftens kapittel IV - dyreart, linje, kjønn, alder, spesielle egenskaper, genmodifikasjoner**

GPR81 (HCA1) KO-mice is the most suitable model for studying the HCAR1 mediated mechanisms in relation to ischemia/stroke.

Søknad 14204: lactate sensing fibroblasts in stroke

**Vedlegg****GMO-melding**

Dokumentreferanse

Dokumentreferanse: [http://asp.gitek.no/fdu/pmws.dll/FDyrDocDownload?\\_FDLKey=20308](http://asp.gitek.no/fdu/pmws.dll/FDyrDocDownload?_FDLKey=20308)

**scoreskjema**

Evaluation of pain and definition of human endpoint

Dokumentreferanse: [http://asp.gitek.no/fdu/pmws.dll/FDyrDocDownload?\\_FDLKey=22669](http://asp.gitek.no/fdu/pmws.dll/FDyrDocDownload?_FDLKey=22669)

**Vedlegg fra Mattilsynet (appendix B)**

UiO - Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag (Domus Medica)  
Domus Medica, Sognsvannsveien 9, PB 1112 Blindern 0316 OSLO

Att. Cecilie Morland

**Statens tilsyn for planter, fisk, dyr og næringsmidler VEDTAK OM BRUK AV FORSØKSDYR - FOTS ID**

**14204**

Fakturaref:

Vår ref: 18/7392 Dato: 19.04.2018 Org.nr: 971 035 854

Virksomhetsnummer 016: UiO - Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag (Domus Medica)

Behandlet av Mattilsynet, 19.04.2018.

**Saken gjelder**

Dette vedtaket gjelder søknad med FOTS id 14204 om forsøk med mus for å studere om økt angiogenese i hjernen via laktatavhengig aktivering av HCAR1 har en beskyttende effekt ved hjerneslag. Hjerneslag er en vanlig årsak til hjerneskade og skade oppstår fordi hjernen ikke har kapasitet til å reparere ischemisk induert skade. Fysisk trening har vist seg å både redusere sannsynligheten for slag og lesjonsområdet forårsaket av slag. Forsøket skal utføre treningsregimer og laktatinjeksjoner før kirurgisk induksjon av slag i villtype mus og i KO-mus som mangler HCAR1. Det skal også utføres adferdstester av kognitive og motoriske funksjoner for å vurdere om mus som mangler HCAR1 utvikler større funksjonelt tap. Forsøket vurderes som betydelig belastende.

Dokumenter i saken:

Revidert søknad i FOTS id 14204, datert 12.4.2018

Innhentet tilleggsinformasjon, datert 18.4.2018 og 13-15.3.2018

**Vedtak**

Mattilsynet gir Cecilie Morland tillatelse til å benytte 600 GPR81-mus i forsøk. 310 dyr skal benyttes i eksperimentene (10 heterozygote, 150 WT og 150 KO), de resterende går med til avl/ blir overskuddsdyr.

Forsøket skal utføres på UiO - Avdeling for komparativ medisin, Institutt for medisinske basalfag (Domus Medica) i perioden 20.4.2018 – 19.4.2022.

Det forutsettes at forsøksansvarlig informerer Mattilsynet om tidskjema for gjennomføring av forsøket slik at det kan tilrettelegges for inspeksjon.

Vedtaket er fattet med hjemmel i forskrift 18. juni 2015 nr. 781 om forsøk med dyr (forsøksdyrforskriften) § 6.

**Begrunnelse**

Vi vurderer at formålet med forsøket og bruken av dyr er tilfredsstillende beskrevet i søknaden, slik at kravene i forsøksdyrforskriften § 10 (formål med forsøket), § 11 (metoder, teststrategier og endepunkter) og § 9 (erstatning, reduksjon og forbedring) er oppfylt. På bakgrunn av en vurdering av hvor nyttig forsøket er i forhold til belastningen for dyrene mener vi at dyr ikke utsettes for unødvendige belastninger, jf. forsøksdyrforskriften § 1.

Forsøket klassifiseres som betydelig belastende jf. forsøksdyrforskriften vedlegg B, del III, m). Dette skyldes hovedsakelig at 2 forsøksgrupper skal gjennomgå høyintensiv trening med utmattelse som endepunkt. For andre grupper blir forsøket vurdert som betydelig belastende grunnet summen av inngrep, behandling og adferds-tester som forced-swim-test. Dette betyr at forsøksansvarlig skal sende inn tilstrekkelig dokumentasjon til Mattilsynet senest 4 mnd. etter avsluttet forsøk. Dokumentasjonen skal være av et slikt omfang at Mattilsynet kan gjøre en retrospektiv evaluering av forsøkets faktiske belastningsgrad.

Vi forutsetter at alle som deltar i forsøket, har fått tilstrekkelig utdanning og opplæring og at deres kompetanse vedlikeholdes, jf. forsøksdyrforskriften § 24.

Ved behov for endringer av den godkjente søknaden må dette sendes til Mattilsynets forsøksdyrenhet via FOTS som søknad/ melding om endring.

Vi minner om kravet om årsrapportering, jf. forsøksdyrforskriften § 36. Manglende rapportering vil kunne medføre at vi ikke behandler nye søknader.

Vi innkrever et gebyr på 6140 NOK (+ 100 NOK i administrasjonsgebyr) for behandling av søknad om godkjenning av dyreforsøk, jf. forskrift 13. februar 2004 nr. 406 om betaling av gebyrer for særskilte ytelser fra Mattilsynet jf. § 5

*Vedtak kan påklages til Mattilsynet, jfr. lov 10 feb 1967 om behandlingsmåten i forvaltningssaker (forvaltningsloven) § 28. Klagefristen er 3 uker fra mottak av dette brev, jfr. forvaltningsloven § 29. Klagen stiles til Mattilsynet, Hovedkontoret, men sendes via avdeling for nasjonale oppgaver.*

Med hilsen

Ole Aamodt  
avdelingssjef

**Kopi:**

personell med særskilt kontrollansvar [postmottak@mattilsynet.no](mailto:postmottak@mattilsynet.no)  
Med hilsen

Johanne Holmen saksbehandler

Telefaks: 23 21 68 01  
[www.mattilsynet.no](http://www.mattilsynet.no)

**Mattilsynet****Avdeling for nasjonale oppgaver**

Saksbehandler: Johanne Holmen Tlf.: 22 40 00 00  
E-post: [postmottak@mattilsynet.no](mailto:postmottak@mattilsynet.no) (Husk mottakers navn)  
Postadresse:  
Felles postmottak, Postboks 383 2381 Brumunddal