

DET ER TID TIL AT VÅGNE OP!

Moderne hjerneforskning bryder nu med en tradition for at bedøve forsøgsdyr, når man undersøger dem med eksempelvis MR-skannere. Bedøvelsen kan nemlig påvirke resultaterne, og når man studerer et fænomen som søvn, må man sammenligne med målinger på vågne, ustressede dyr.

Om forfatterne



Thomas Beck Lindhardt er ph.d.-studerende ved Center for Funktionelt Integrativt Neurovidenskab, Aarhus Universitet og forsker i søvn. tblindhardt@cfm.au.dk



Brian Hansen er lektor ved Center for Funktionelt Integrativt Neurovidenskab, Aarhus Universitet og forsker i udviklingen af MRI-teknikker til studier af hjernen og til diagnostik. brian@cfm.au.dk

Søvnprojektet omtalt i artiklen er finansieret af Sino-Danish Center og Aarhus Universitets Forskningsfond

Vi mennesker bruger en tredjedel af vores liv på at sove, men vi ved stadig ikke med sikkerhed hvorfor. Ny forskning tyder på, at søvn spiller en vigtig rolle i at holde hjernen rask. For eksempel diskuteres det i dag, om søvn mon hjælper til at rense hjernen for affaldsstoffer. At forstå den mekanisme kan vise sig afgørende i arbejdet med at forhindre udvikling af alvorlige hjernesygdomme som demens.

I studiet af søvnens fysiologi er det nødvendigt at studere både den sovende og den vågne tilstand – ofte i organismer, som kan manipuleres (for eksempel genetisk), så de udvikler sygdomme. Det kan man kun med forsøgsdyr. Traditionelle dyreforsøg udføres næsten altid i bedøvede dyr. Bedøvelse minder om søvn, men er alligevel ikke helt det samme. Studier i vågne dyr er en stor udfordring, men er nødvendige for at kunne forstå, hvordan den vågne hjerne er anderledes end hjernen under søvn eller bedøvelse. Skiftet til studier af vågne dyr er en stor ændring af etableret praksis for dyreforsøg. I denne artikel vil vi give et overblik over baggrund og formål med at lave skanningsforsøg i vågne dyr.

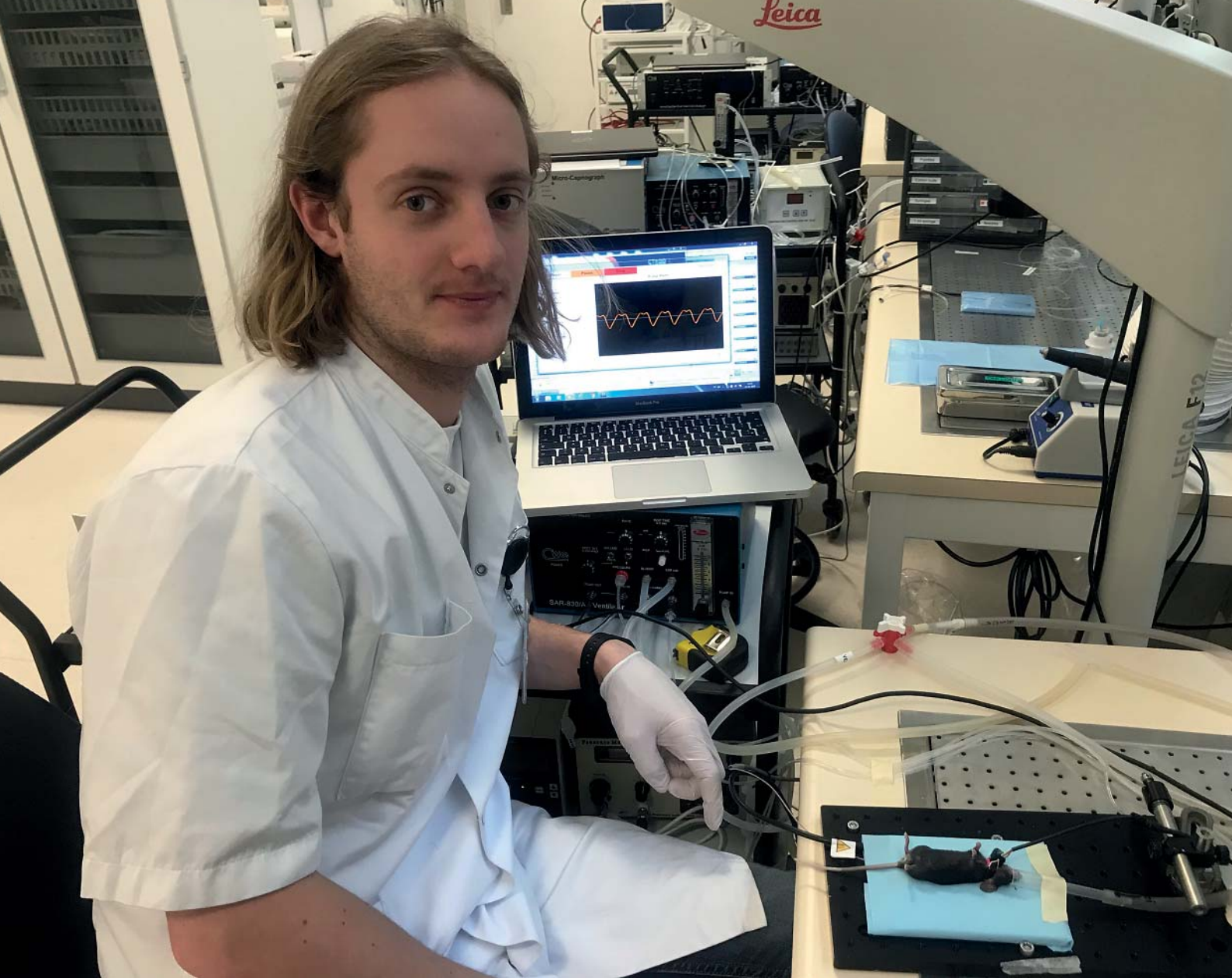
Århundredes forskning bygger på dyreforsøg

Stort set alle medicinske gennembrud gennem tiden har bygget på forsøg udført i dyr. Organtransplantationer, vacciner og antibiotika er blot få eksempler på metoder og medicin, som i dag redder millionvis af menneske- og dyreliv verden over, alt sammen takket være dyreforsøg. Desværre eksisterer der stadig en lang række alvorlige sygdomme, som vi ikke er i stand til at kurere – ikke mindst hjernesygdomme. Derfor anvendes forsøgsdyr i stor stil i hjerneforskning som et redskab til at forstå sygdomsophav og finde effektive behandlinger.

Til at udforske og studere hjernen benytter man alt fra snegle og orm til mennesker, men oftest rotter og mus. Disse forsøgsdyr bruges især, fordi de er pattedyr med en kort livscyklus, hvilket gør at deres fysiologi ikke er ulig menneskers, og at det samtidig er muligt at følge dem igennem hele deres liv samt gennem flere generationer. Dette er en fordel, fordi mange af de fysiologiske og strukturelle ændringer, der i mennesker udvikles over flere årtier som følge af sygdom eller dårlig livstil, i dyr kan studeres over blot få måneder.

Når mennesker udvikler sygdom, er der ofte tale om et samspil af mange risikofaktorer såsom genetik, livsstil og ydre risikofaktorer. Det vanskeliggør studiet af en isoleret sygdomsmekanisme. Fordelen ved at benytte forsøgsdyr er, at det her er lettere at sikre, at dyrene har været udsat for det samme. Det er altså muligt at opnå en mere ensartet forsøgsgruppe, og dermed kan man udelukke mange arvelige og miljømæssige faktorer. Derudover kan mus og rotters fysiologi og genetik også manipuleres. Det er en stor fordel i hjerneforskningen, hvor man ofte ønsker at studere, hvilke genetiske eller fysiologiske mekanismer der forårsager sygdomme i hjernen.

På verdensplan bruges årligt over 100 millioner forsøgsdyr. Det er mange, og der er derfor stort fokus på at nedbringe antallet af nødvendige forsøgsdyr. Forskere gør derfor også brug af metoder, hvor dyr ikke anvendes, for eksempel computersimuleringer og målinger i kunstige modelsystemer eller dyrkede cellekulturer. Der findes dog mange tilfælde, hvor disse metoder ikke er tilstrækkelige, og derfor forbliver dyreforsøg nødvendige. Især forskningsområder som demens og søvn involverer meget komplekse fysiologiske mekanismer, som berører



hele organismen. Derfor kan de kun studeres i det intakte, levende dyr.

Hjerneforskningens teknikker

I studiet af hjernen ønsker man typisk at kortlægge, hvor i hjernen der er sket en ændring af hjerneaktivitet, fysiologi eller struktur – for eksempel som følge af sygdom. En af de mest populære teknikker, som bruges til netop dette formål, er MR-skanning (det vil sige billeddannelse ved hjælp af magnetisk resonans). MR-skanning er en ufarlig teknik, der kan optage detaljerede billeder af hjernen ved hjælp af et stærkt, permanent magnetfelt, tidsvarierende magnetfelter og radiobølger. Afhængigt af, hvilken skanningsteknik der benyttes, kan MR-skanneren optage billeder, som kan bruges til enten at kortlægge hjerneaktivitet og fysiologiske

ændringer (funktionelle billeder), mikroskopiske vævforandringer (for eksempel med diffusions-MR), eller ændringer i hjernens større strukturer (strukturelle eller anatomiske billeder). I nogle sygdomme (eksempelvis i demens) ses forandringer i alle disse billedtyper på forskellige stadier af sygdommens udvikling. De første MR-skannere, man byggede, var ikke kraftige nok til at optage brugbare billeder i små hjerner som hos rotter og mus. Efterhånden som MR-teknologien er blevet mere avanceret, er det blevet muligt at optage meget detaljerede billeder af selv små dyrs hjerner (en musehjerne er cirka 10-15 mm lang).

Bedøvelse som fejlkilde

I dyreforsøg er det almindelig praksis at bedøve dyrene, så de ikke lider under eksperimenterne. Og

det har passeret godt til eksperimenter med MR-skannere, hvor det er vigtigt, at forsøgspersonen eller forsøgsdyret ligger stille inde i skanneren, da bevægelse under skanningen ødelægger billederne. I mange årtier er hjerneforskning med forsøgsdyr derfor foregået med bedøvede dyr. Det har genereret mange gode resultater, som har hjulpet os med at forstå mange grundlæggende aspekter af hjernen og dens komplicerede fysiologi, for eksempel hvordan hjernens blodforsyning reguleres.

Med tiden er vi dog nået til et teknologisk stadie, hvor de målemetoder, vi benytter (herunder MR-skanning), har opnået en så stor følsomhed i målingerne, at bedøvelsens effekt på dyrets fysiologi ikke længere kan ignoreres: Bedøvelsen forstyrrer

En af artiklens forfattere (Thomas) ved en typisk arbejdsstation, hvor han er i gang med at monitorere puls og vejrtrækning i en mus under bedøvelse.

Foto: Brian Hansen



Fotos: Thomas Beck Lindhardt

Brug af nakkekrave som hovedholder

For at kunne foretage MR-skanninger med forsøgsdyr i vågen tilstand er man nødt til at fastholde dem. Det kan enten gøres ved at bygge et leje, hvori musen fastspændes omkring krop og hoved. Den anden mulighed er at montere en nakkekrave eller hovedholder, som dyret går med permanent og derved vænner sig til. Denne hovedholder har en klampe-mekanisme, som gør det muligt at spænde dyret fast til et leje, som indsættes i MR-skanneren. Det er den metode, vi bruger ved CFIN.

På billedet til venstre ses en normal laboratoriemus, og på billedet til højre ses en laboratoriemus med en indopereret hovedholder. Under operationen er musene bedøvet, og efter opvågning får de både smertestillende medicin og antibiotika for at undgå smerte og udvikling af infektion. Hovedholderen forårsager ikke noget ubehag og er designet således, at musene stadig har fri mulighed for at spise og bevæge sig uden problemer. De indopererede hovedholdere er 3D-printede og er lavet af et ikke-magnetisk materiale, så de kan bruges i MR-skanneren.



Ved CFIN har vi etableret en metode, så dyrenes træningsmiljø næsten er identisk med det faktiske skannermiljø. Ved hjælp af en 3D-printer har vi skabt et dyreleje, som passer til mus. Lejet passer ind i en boks, hvor der på begge sider af musens hoved er højtalere, som kan afspille de samme lyde, som MR-skanneren udsender. Musene fastspændes til lejet ved hjælp af en indopereret hovedholder. Lejet kan følge med dyret ind i MR-skanneren, så forskellen fra træningsmiljøet til skannermiljøet er minimal.

de mekanismer, man ønsker at studere. Man ved nu, at bedøvelse påvirker både hjerneaktivitet og hjernefysiologi på måder, som er u hensigtsmæssige for eksperimenterne. Disse ændringer afhænger også af, hvilken type bedøvelsesmiddel der anvendes, og derfor skal man være forsigtig, når man fortolker og sammenligner måleresultater.

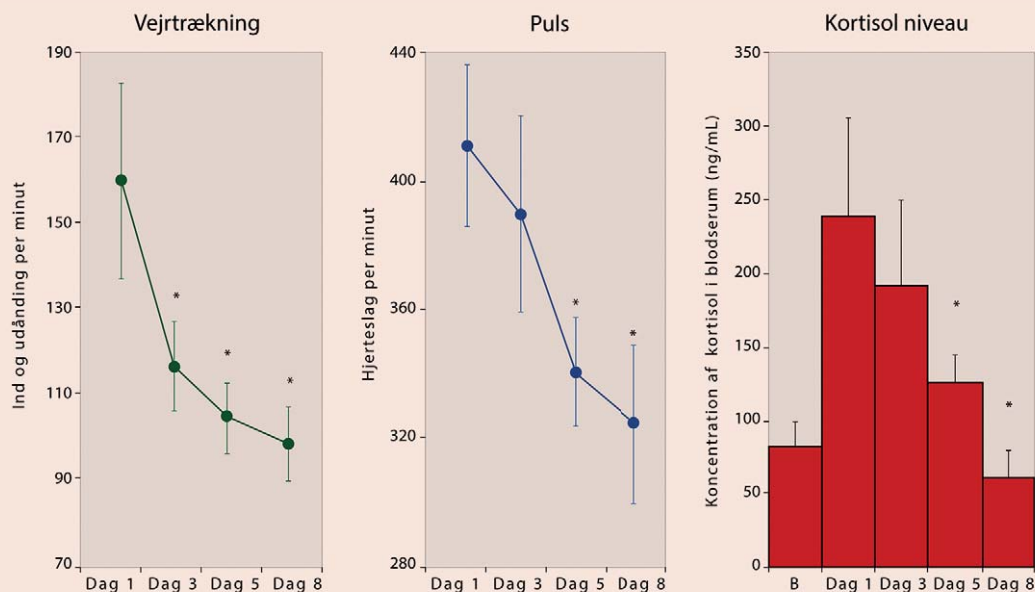
I arbejdet med at forbedre vores forståelse af hjernen og sikre, at de videnskabelige konklusioner fra forsøgsdyr kan overføres til mennesker, er vi derfor nødt til at kunne studere ubedøvede dyr for at undgå, at de biologiske systemer forstyrres af bedøvelsen. Mange forskningslaboratorier arbejder derfor nu hen imod at foretage eksempelvis MR-skanninger i vågne dyr.

Vågn op!

Overgangen til at arbejde med vågne dyr har mange udfordringer. Alle, der arbejder med forsøgsdyr, tilstræber, at dyret ikke lider under forsøget, og man søger af denne grund også at undgå, at dyret stresses. Det bedøvede dyr bevæger sig ikke under skanning, men ved skanning af vågne dyr er man nødt til at fastgøre dyret. Når rotter og mus fastspændes, enten via en indopereret hovedholder eller ved at bruge et fastgørelsessæt, bliver de meget stressede, og de vil forsøge at kæmpe sig fri. Det skaber en u hensigtsmæssig situation, hvor dyret både oplever ubehag og stress, som påvirker hjerneaktivitet og fysiologi (tænk bare på din puls, når du selv er bange). Derfor kan de hjerneskaninger, der optages i stressede dyr også være forurennet af dyrets stress.

Heldigvis har forskere vist, at dette kan undgås ved gradvist at tilvænne og træne dyrene, så man starter med at fastspænde dyrene i kun 1-2 minutter og gradvist øger varigheden over de følgende dage. Dyrenes velbefindende følges både under træning (ved at måle dyrenes puls og vejrtrækning) og i burene efterfølgende.

Træning til ophold i en MR-skanner



Figur efter Ferris et al., 2011

Når man benytter vågne forsøgsdyr i forbindelse med MR-skanninger er det nødvendigt at træne dyrene til at være trygge ved at være fastspændt og ved de høje lyde, som MR-skanneren udsender. Dette er vigtigt for at minimere dyrenes stress og for at undgå de medfølgende fysiologiske ændringer, som stress forårsager i hjernen. En forskergruppe i Boston har testet, hvordan rotters vejrtrækning og hjerterytme samt stressniveau ændrer sig, hvis man træner dem i et MR-miljø i otte dage.

På den første figur ses, hvordan rotternes gennemsnit-

lige vejrtrækning sænkes markant efter bare få dages træning. På figuren i midten ses, hvordan rotternes gennemsnitlige puls også falder markant i takt med, at de trænes over flere dage. På den sidste figur (til højre) ses det, hvordan niveauet af stresshormonet kortisol også falder markant gennem de 8 dages træning. På denne måde opnår man, at dyrene er trygge under skanningen, og at målingerne ikke forstyrres af dyrets stress. Stjernerne indikerer, om der er statistisk signifikans (sammenlignet med Dag 1), og de lodrette streger udviser standardafvigelsen.

Efter flere dages træning, kan man se, at dyrene har normal puls og vejrtrækningsrytme, når de er fastgjort. På den måde sikrer man, at dyrene vænner sig så meget til det simulerede skannermiljø, at deres stressniveau bliver lavt nok til, at dyrene er egnede til forsøg. Der findes adskillige teknikker, som kan hjælpe med at reducere dyrenes ubehag i forbindelse med at blive fastspændt. Det er for eksempel muligt at installere et løbebånd under dyret, således de har oplevelsen af stadig at kunne bevæge sig. Denne følelse af frihed sænker stress-niveauet hos dyret.

Efter endt optræning er dyrene trygge både under træning og skanning. Optræningen er mand-skabskrævende, fordi dyrets daglige træning foregår under observation.

Det er dog indsatsen værd, fordi skanning af vågne dyr giver MR-forskere en ny platform, hvorfra det er muligt at studere hjernen i dens naturlige tilstand, fri for bedøvelsens forstyrrende effekter. På sigt vil dette medføre, at vi får bedre videnskabelige resultater, som samtidig er lettere at overføre fra grundforskningen til klinisk forskning.

Vågne dyr hjælper søvnforskningen

Ved Aarhus Universitets hjerneforskningscenter CFIN er vi ved at starte et nyt projekt om søvn, hvor MR-skanning af vågne dyr er nødvendigt for at kunne sammenligne med den sovende hjerne. Vi bruger bedøvede mus i stedet for naturligt sovende, fordi studier har vist, at bedøvelse er tilstrækkeligt "søvn-lignende" til at kunne erstatte

ægte søvn i vores eksperimenter. Det er godt, for MR-skannere larmer så meget, at man næppe kan få dyr til at sove naturlig søvn under skanningen.

I projektet skal måledata optaget i bedøvede dyr sammenlignes med målinger fra vågne dyr. Derved kan vi afklare, hvordan hjernens fysiologi ændres under søvnlignende tilstand. Det er vigtigt, for megen hjerneforskning, med både dyr og mennesker, har efterhånden bevist, at søvn er utrolig vigtig for kroppens og hjernens evne til at fungere optimalt samt modstå sygdomme. Søvnmangel og dårlig søvn ødelægger kroppens immunforsvar og øger risikoen for at udvikle kræft. Derudover øges risikoen for diabetes, hjertestop og udviklingen af demens. Særligt Alzheimer-demens

Videre læsning

Om MR-teknikken:
Brian Hansen: Mikroskopi med MR-scanneren, *Aktuel Naturvidenskab*, 4-2010

Om søvn:
Matthew Walker: Derfor sover vi. *Rosinante* 2019.

Om dyreforsøg:
"Forsøgsdyr - og alternativer", Miljø og fødevareministeriet & Danmarks 3R-Center <https://3rcenter.dk/forsoegsdyr/>

Avanceret læsning:
Hoyer, C. et al (2014). Advantages and challenges of small animal magnetic resonance imaging as a translational tool. *Neuropsychobiology*, 69, 187–201.

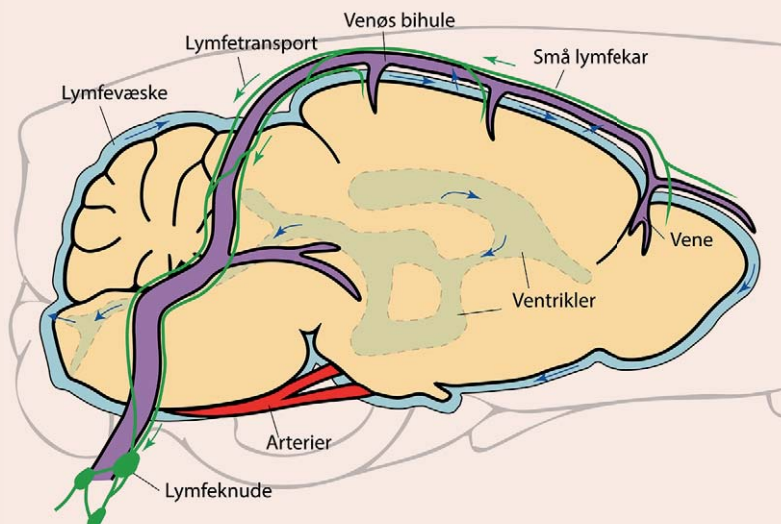
Desjardins, M. et al (2019). Archival Report Awake Mouse Imaging: From Two-Photon Microscopy to Blood Oxygen – Level Dependent Functional Magnetic Resonance Imaging. *Biological Psychiatry: CNNI*, (2), 1–10.

Ferris, C. F. et al (2011). Functional magnetic resonance imaging in awake animals. *Reviews in the Neurosciences*, 22(6), 665–674.

Fysiologisk ændringer i bedøvet tilstand

Under søvn eller bedøvelse sker der forskellige ændringer i både kroppen og hjernen. Når vi sover eller er bedøvet, mister vi bevidstheden, og samtidig bliver musklerne helt slappe. Derudover kan der observeres ændringer i fysiologi såsom hjerterytme, blodtryk og hjerneaktivitet. Der sker også ændringer i blodforsyningen til hjernen, graden af væksthormoner, der frigives, samt dynamikken af væsketransport i hjernen, men præcis hvordan, disse ændringer hænger sammen med søvn, er stadig uklart.

Mange af de generelle fysiologiske ændringer, der optræder i søvnstadiet, minder meget om de fysiologiske ændringer, der kan observeres i bedøvet tilstand. Af denne grund kan man derfor benytte bedøvelse som kunstig søvn i de forsknings-sammenhænge, hvor man ønsker at studere søvn, men hvor naturlig søvn ikke er muligt. Det er dog vigtigt at tage forbehold for både dosering og type af narkose, da disse har stor betydning for, hvordan fysiologien ændres. På figuren ses en grafisk afbildning af en musehjerne. Her ses det, hvordan



Sammenligning af hjernefysiologi i forskellige tilstande



hjernen er omkranset af lymfevæske. Lymfevæske produceres blandt andet i ventriklerne og kan derfra nå ud til forskellige dele af hjernen. Udenpå venerne løber små lymfekar, som sørger for at transportere cellerester, som lymfevæsken har opsamlet, ud af hjernen og ned til lymfeknuder udenfor kraniet.

Fysiologiske ændringer i sovende/bedøvet tilstand:

- Hjerterytme ↓
- Blodtryk ↓
- Hjerneaktivitet ↓
- Væsketransport i ↓↑ hjernen
- Væksthormoner ?
- Blodforsyning...

Grafik: Thomas Beck Lindhardt, inspireret af Louveau, A. et al (2016), *Neuron*, 91(5), 957–973.

ser ud til at være koblet til søvn, men hvordan sygdommen opstår, og hvilken præcis rolle søvn har for udviklingen heraf, hersker der stadig megen tvivl om.

Vi har sat os for at studere søvnens rolle for hjernens fysiologi med en række nye eksperimenter. Målet er at kortlægge søvnrelaterede fysiologiske mekanismer, som bidrager til at holde hjernens indre miljø sundt og raskt. Vi vil til det formål fokusere på væsketransport i hjernen, særligt cirkulation af lymfevæske i hjernen. Lymfevæske er en klar væske, som i kroppen transporteres rundt via lymfekar og som blandt andet har den funktion at rense væv og organer for affaldsstoffer.

Ny forskning tyder på, at søvn har indvirkning på lymfetransporten i hjernen og måske dermed på, hvor godt hjernen renses – eksempelvis for de skadelige proteiner, som menes at være årsagen til, at demens opstår. Resultater fra forskellige forskningsgrupper er dog uforenelige.

Nogle studier peger på, at søvn (og bedøvelse) øger effektiviteten af væsketransporten, mens andre studier tyder på, at søvn ikke har nogen betydning for væsketransporten. For at afgøre om søvn virkelig har indflydelse på væsketransport i hjernen, er det derfor nødvendigt med velplanlagte studier og meningsfulde metodevalg, som tager højde for de eksisterende problem-

stillinger i litteraturen.

I vores studie vil vi derfor sammenligne en række forskellige typer MR-scanninger i både vågne (ubedøvede) og bedøvede dyr. Hermed kan vi undersøge, om søvnlignende tilstande påvirker væsketransporten og effektiviteten af lymfesystemet i hjernen. Hvis det viser sig, at hjernens lymfesystem renses vævet for de farlige proteiner, og at dette sker bedst under søvn, vil man have opklaret en vigtig fysiologisk funktion af søvn. Samtidig åbner denne indsigt for nye strategier til at forebygge og behandle demenssygdomme. Disse eksperimenter kan kun laves med vågne forsøgsdyr. Så sagen er klar: søvn er vigtig, men det er tid at vågne op. ■