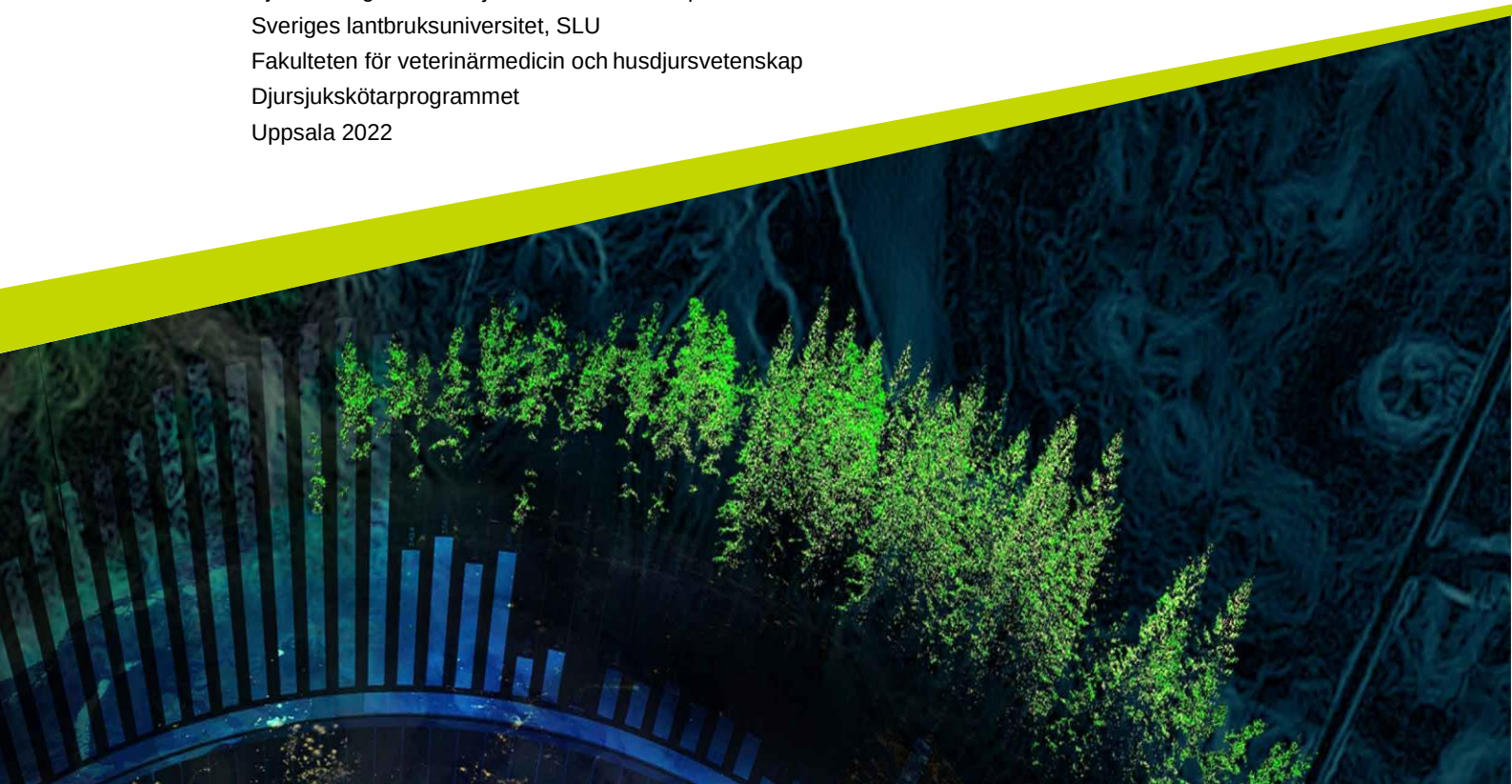




Stressbeteenden hos råtta vid induktion av anestesi i inhalationskammare

Fredrik Lövgren & Jonas Lindh

Självständigt arbete i djuromvårdnad • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Djursjukskötarprogrammet
Uppsala 2022



Stressbeteenden hos råtta vid induktion av anestesi i inhalationskammare.

Stress related behaviors in rats during induction of anesthesia using inhalation chamber.

Fredrik Lövgren och Jonas Lindh

Handledare: Anneli Rydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Patricia Hedenqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i djuromvårdnad

Kurskod: EX0994

Program: Djursjukskötarprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2022

Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd

Nyckelord: Beteende, excitation, färskgasflöde, gaskoncentration, gnagare, isofluran, stress, induktionstid, uppvakningstid

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Avdelning anestesiologi

Sammanfattning

Inom forskningen är råttor vanliga försöksdjur. Anestesi av dessa råttor är i många studier nödvändigt för att kunna utföra den tänkta studien, och det är därför viktigt att bästa protokoll och teknik används för att minska eventuell stress och lidande. Trots detta har få studier gjorts som undersöker faktorer som kan påverka stressnivån vid induktion av gasanestesi på råttor.

Vid induktion av anestesi i inhalationskammare (volym 6 liter) med isofluran undersöktes effekten av olika kombinationer av färskgasflöden och inställningar på förgasaren. Råttornas beteende under induktionen studerades enligt ett förbestämt bedömningsprotokoll för att registrera antal beteenden som kunde observeras vid de olika kombinationerna. Även tid till medvetslöshet och återgång till vaket tillstånd dokumenterades för att undersöka huruvida detta korrelerade till antal stressbeteenden och förekomst av excitation.

Efter inledande utprovningar randomiserades råttorna till 3 grupper, varav en kontroll, och inducerades med kombinationer av färskgasflödena 3 l/min eller 6 l/min och förgasarinställningen 5 %. Ingen skillnad kunde ses mellan grupperna gällande antal uppvisade stressbeteenden. Råttorna som inducerades med 6 l/min konstaterades medvetlösa tidigare än de råttor som inducerades 3 l/min men tog samtidigt längre tid att nå vaket tillstånd efter induktionen.

Nyckelord: Beteende, excitation, färskgasflöde, förgasarinställning, gaskoncentration, gnagare, isofluran, induktionstid, stress, uppvakningstid

Abstract

Rats are commonly used as laboratory animals in scientific research. These rats are often subjects to anesthesia which is why it is important to use the best protocols and technique to reduce potential stress and suffering. Despite the need for further knowledge on the subject, few studies exist that examine factors that may affect the stress level of the rats during induction of inhalation anesthesia.

During induction of anesthesia with isoflurane, using an inhalation chamber (volume 6 L), the effects of different combinations of fresh gas flow and vaporiser settings were studied. The behavior of the rats during the induction was compared against a predetermined behavior matrix and the number of the performed behaviors was registered. Time until loss and regain of consciousness was documented to examine which combination resulted in the fastest induction, and whether it correlated with the number of stress related behaviors or the presence of excitement.

After initial trials the rats were randomly divided into three groups, with one control, and anesthesia was induced with fresh gas flow of 3 l/min or 6 l/min with a vaporiser setting of 5 %. No statistical difference in numbers of performed stress related behaviors could be seen between the groups. The rats induced with 6 l/min were deemed to have lost consciousness earlier than the group induced with 3 l/min, but also took a longer time to regain consciousness.

Keywords: Behavior, excitation, fresh gas flow, gas anesthesia, gas concentration, induction time, isoflurane, rodent, recovery time, stress, vaporiser settings

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	7
Figurförteckning	8
1. Inledning	9
1.1 Syfte	9
1.2 Frågeställning.....	10
2. Bakgrund	11
2.1 3R – Replace, Reduce, Refine	11
2.2 Induktion av anestesi på råttor	11
2.3 Akuta stressbeteenden hos råttor	12
2.4 Excitation i samband med anestesi	13
2.5 Isofluran som anestetikum	13
2.6 Anestesisystem – Flöden och gaskoncentrationer	14
2.7 Anestesisystem – Cirkelsystem	14
3. Material och metod	16
3.1 Material	16
3.1.1 Djur och djurhållning	16
3.1.2 Utrustning.....	16
3.2 Metod	17
3.2.1 Sökprocess	17
3.2.2 Utprovning 1, utrustning.....	18
3.2.3 Utprovning 2, färskgasflöden och koncentration	18
3.2.4 Studie.....	20
3.2.5 Bearbetning av data och statistisk analys	21
4. Resultat	22
4.1 Utprovning 1, utrustning	22
4.2 Utprovning 2, färskgasflöden och koncentration.....	22
4.3 Studie	23
5. Diskussion	27
6. Konklusion.....	33
Referenser.....	34

Tack37

Tabellförteckning

Tabell 1. Antal råttor samt kombination av färskgasflöden och förgasarinställningar som användes för utprovning 2	18
Tabell 2. Antal råttor samt kombination av färskgasflöden och förgasarinställningar som användes för i grupperna under studien	20
Tabell 3. Stressbeteenden som observerades vid granskning av inspelat material, samt definition av dessa.	21
Tabell 4. Utprovning av utrustning. Tid till högsta uppnådda koncentration vid förgasarinställning 3 och 5 % vid färskgasflöde 0, 1, 3, och 6 l/min. Uppmätt decibel (range och medel) under påfyllnad av kammaren och temperatur i kammaren vid de olika inställningarna	22
Tabell 5. Resultat av utprovning 2. Råttor inducerades med isofluran. Koncentration i kammaren, tid till medvetslöshet, tid till vaket tillstånd samt förekomst av excitation dokumenterades.	23
Tabell 6. Förekomst av excitation vid induktion och uppvakning under utprovning 2	23
Tabell 7. Antal råttor som utförde respektive stressbeteende i de olika grupperna under studien. Kontrollgruppen utsattes ej för isofluran. Förgasarinställning 5 % användes för grupp 1 och 2.	24
Tabell 8. Antal råttor som exciterade vid induktion och uppvakning.	24
Tabell 9. Tid tills respektive råtta uppnått vaket tillstånd efter induktion av anestesi med isofluran..	26

Figurförteckning

Figur 1. Inhalationskammare med slangar för anestesigas och frånluft, samt samlingslang för gasmonitorering och termometer.	17
Figur 2. Vänster: Bild på råtta i inhalationskammare. Höger: Bild på råtta i uppvakningslåda.	19
Figur 3. Tid till medvetslöshet (sekunder) och isoflurankoncentration (%) i kammaren vid inträffande av medvetslöshet hos råttor. FGF 3 L/min eller 6 L/min och förgasarinställning 5% isofluran.	25

1. Inledning

Användandet av råttor som försöksdjur är vanligt inom forskningen. År 2018 rapporterades att det inom EU och Norge användes cirka en miljon råttor i olika studier (European Commission 2021). Vid användning av försöksdjur är det forskarens ansvar att minimera djurens lidande och obehag i möjligaste mån. I den svenska lagstiftningen har Europaparlamentets och rådets försöksdjursdirektiv (2010/63/EU) införlivats för att förbättra situationen för djur som används inom djurförsök. Detta innebär att principerna 3R som står för replace, reduce och refine (ersätta, minska och förfinas) skall tillämpas i största möjliga mån inom forskning där djur används.

Ett område där förbättringar är möjliga inom forskning där försöksdjur används är vid sövning av djuren. Användandet av gas vid induktion av anestesi på gnagare är en vanlig metod enligt Longley (2008) men skulle kunna medföra en ökad stress för djuren. Stresspåslag hos en patient inför anestesi ger en negativ effekt då det påverkar bland annat det sympatiska nervsystemet och stimulerar en frisättning av norefedrin, efedrin samt glukokortikoider (Harris 2016). Harris (2016) skriver också att stressen påverkar kroppstemperaturen vilket kan leda till hypertermi. Stress kan även påverka det rumsliga minnet och igenkänningsminnet negativt (Cazakoff et al. 2010). På grund av stressens inverkan på kroppen och eventuellt lidande är det viktigt att veta vad som utlöser stress och hur vi kan minimera detta. I denna studie undersöks om antal stressbeteenden förändras vid induktion av anestesi om olika färskgasflöden och förgasarinställningar används.

Utprovning av utrustning (nedan kallad utprovning 1) samt utprovning av kombinationer av färskgasflöden och inställningar på förgasaren (nedan kallad utprovning 2) utfördes inför studien. Resultatet av dessa utprovningar användes för att fastställa de flöden och förgasarinställningar som sedan användes i studien.

1.1 Syfte

Syftet med denna studie är att undersöka om olika färskgasflöden och förgasarinställningar samt tid till medvetslöshet påverkar stressbeteenden hos råttor vid induktion av anestesi i inhalationskammare.

1.2 Frågeställning

- Påverkar färskgasflöde och koncentration av isofluran stressbeteenden vid induktion av råttor med inhalationskammare?

2. Bakgrund

Denna studie är en del av ett större projekt där effekten av premedicinering vid induktion av anestesi på råttor kommer att undersökas.

2.1 3R – Replace, Reduce, Refine

I djurskyddslagen (2018:1192) står det i kapitel 7, 1 § gällande försöksdjur att djuren inte skall utsättas för större lidande än vad som är absolut nödvändigt. Detta gör att de ansvariga inom forskning där försöksdjur används är skyldiga att genomföra de åtgärder och förändringar som krävs för att efterleva detta.

Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om försöksdjur (Statens jordbruksverks författningssamling, SJVFS 2019:9) nämner i kapitel 16, 4 § om Gemensamma bestämmelser för skötsel och hållande att information om 3R-principen skall finnas tillgänglig för personal som arbetar på en försöksdjursanläggning.

Principen för 3R formulerades år 1959 av forskarna William Russell och Rex Burch i deras bok *The principles of humane experimental technique*. På svenska står 3R för ersätta, minska och förfina, och syftar till att lägga fokus på försöksdjurens välfärd inom försöksdjursindustrin (Jordbruksverket 2022). För att efterleva dessa principer skriver Jordbruksverket bland annat att antalet djur i tester skall hållas till ett lägsta möjligt antal, samt att metoder skall utformas för att minska stress och lidande men även att öka välfärden för djurens berikning av miljön.

2.2 Induktion av anestesi på råttor

Vid induktion av anestesi på råttor finns det olika metoder att tillgå, bland annat genom injektion eller att söva med anestesigas via mask. Nackdelar med dessa två metoder är att råttan behöver immobiliseras och att den kan uppleva stress när masken placeras över nosen. I boken *Anaesthesia of Exotic Pets* skriver Longley (2008) att nackdelar med injektioner bland annat är att råttan upplever smärta samt att det är en svårare metod att administrera läkemedel på. Vidare menar författaren

att användning av mask vid inhalationsanestesi leder till risk för läckage av anestesigas vilket kan påverka personalens hälsa negativt. En generell fördel med inhalationsanestesi är dock att syre ofta används i den bärgas som transporterar anestesimedlet till patienten, vilket har en positiv effekt på syresättning av vävnader under anestesi.

En annan metod är att söva djuret med inhalationsgas i en inhalationskammare. Användandet av inhalationskammare vid induktion av anestesi har flera fördelar gentemot injektionsanestesi enligt en studie av Longley (2008). Studien lyfter fram att immobilisering av råttan ej krävs, samt att eventuell smärta kopplat till injektionen och varierande individuell respons på injektionsanestetikan undviks. Immobilisering krävs även vid induktion med mask för att säkerställa att anestesigasen administreras korrekt. Vid induktion i kammare hanteras råttan endast vid flytt från hemburen till inhalationskammaren vilket minimerar risken att hanteringen orsakar stress inför induktionen. David et al. (2015) menar i sin artikel att en separat inhalationskammare är att föredra vid anestesi av gnagare jämfört med att söva djuret i sin hemmabur. Studien av Davis et al. (2015) visade på ökade stressreaktioner vid förändringar i hemmiljön, vilka undviks vid användande av inhalationskammare. En nackdel med inhalationskammare är att den försvårar monitorering av hjärtfrekvens, andningsfrekvens och övriga vitalparametrar då möjligheten att vidröra råttan är begränsad (McKelvey & Hollingshead 2003). Andningsfrekvensen kan monitoreras okulärt genom kammaren om den är av genomskinligt material, men kan försvåras beroende på råttans position i kammaren.

2.3 Akuta stressbeteenden hos råttor

I en studie av Harkin et al. (2002) visade resultatet att stressorer, såsom nya dofter samt störande luftflöden, kan upplevas som stressfullt för råttor vilket är relevant i sammanband med gasanestesi. I ovan nämnda studie användes råttor som var vana vid hantering och dessa visade inte på ökad stressreaktion vid hanteringen. Harkin et al. (2002) menar att ambulatoriskt beteende ej var en tydlig respons på en stressor och visar på behovet av mer noggranna studier av finmotoriska beteenden som indikation på stress hos råttor. Resultatet från studien av Sturman et al. (2018) visar att beteendet att ställa sig på bakbenen utan stöd med frambenen kan associeras med stress hos möss, vilket skulle kunna stämma även för råttor. Även ambulatorisk inaktivitet som "frysning" kan tyda på stress och ångest hos djuren (Koolhaas et al. 1997).

Att råttor har känslig hörsel konstateras i studien av Heffner et al. (1994) vilket innebär att höga ljud kan vara en faktor att ta med i beräkning vid induktion av anestesi då detta skulle kunna påverka djuren negativt gällande stressnivån.

I denna studie undersöktes råttor under induktion av anestesi i inhalationskammare, vilket innebar en plötslig förändring i deras miljö vilket kan resultera i snabbt insättande beteenden som svar på dessa förändringar. Med akuta stressbeteenden avses reaktioner som inträder snabbt när råttorna utsätts för en plötsligt insättande stressor och sedan avtar efter det att stressorn upphört. Exempel på stressbeteenden som inkluderades i denna studie var putsning, tuggning, urinerings och frysning. En komplett sammanställning av samtliga beteenden som studerades i denna studie finns redovisad i en tabell under kapitlet material och metod.

2.4 Excitation i samband med anestesi

Excitation är ett naturligt förekommande stadium både vid induktion och uppvakning i samband med anestesi (Thomas, A. J & Lerche, P 2017). Det orsakas av att koncentrationen läkemedel i kroppen endast räcker för hämning av inhiberande neuron men inte till hämningen av de exciterande. Individen kan då bli hyperexcitabel och känslig för yttre stimuli (Bodelsson et al. 2005). Vid excitation i försöker djuret instinktivt kämpa emot förlusten av kroppskontroll då den börjar förlora medvetandet (McKelvey & Hollingshead 2003). Snabba kroppsrörelser och vokalisering kan vara tecken på excitation, vilket sker omedvetet hos patienten (McKelvey & Hollingshead 2003). Thomas & Lerche (2017) skriver att patienten vid excitation riskerar att skada sig själv eller personalen fysiskt. Tidigare nämnda författare menar även att tiden patienten befinner sig i excitationsstadiet bör minimeras i största möjliga mån för att minska risken för komplikationer såsom arytmier och hjärtstillestånd.

2.5 Isofluran som anestetikum

Isofluran och sevofluran används ofta vid induktion av anestesi på gnagare (Herrmann & Flecknell 2019). Fördelen med inhalationsanestetika är att anestesidjupet snabbt kan justeras under en operation, även om själva induktionen ofta tar något längre tid än induktion med injektionsanestetika (Thomas & Lerche 2017). Fördelar med isofluran är att den är billigare än sevofluran samt att den underlättar detektion av läckage på grund av dess lukt (Ries et al. 1999; Fornes 2010). Framkallandet av stressbeteenden hos gnagare kopplat till induktion med isofluran har studerats i begränsad omfattning. En ökad förståelse för hur induktionstekniken påverkar råttor kan vara positivt för djurvälståndet om den kan

utföras med ett lägre stresspåslag. Boulanger et al. (2015) observerade i sin studie att förekomsten av ett undvikande beteende inte ökade hos råttor då de utsattes för isofluran jämfört med sevofluran, trots isofluranets karakteristiska lukt. Studien av Balla et al. (2014) inkluderade få individer, men kan tyda på att anestesi och induktion med isofluran skulle kunna leda till ökade kortikosteron nivåer i blodet hos gnagare, vilket kan kopplas till stress. En studie utförd på möss tyder på att induktion av anestesi med isofluran kan upplevas stressfullt då bland annat excitation och urinerings kunde observeras under induktion (Tsukamoto et al. 2015). Även en studie på råttor visade på en ökad förekomst av urinerings och defekering vid induktion med isofluran jämfört med då premedicinering användes (Tsukamoto et al. 2016). Förgasarinställningar mellan 2 och 5 % isofluran användes i flertalet studier för induktion av anestesi av råttor utan premedicinering (Marquardt et al. 2018; Balla et al. 2014; Longley 2008). Detta låg till grund för valet av förgasarinställning i denna studie .

2.6 Anestesisystem – Flöden och gaskoncentrationer

Vid induktion med gas är det viktigt med goda kunskaper om utrustningen och vilka mekanismer som påverkar anestesisgaskoncentrationen som levereras till patienten. Dorsch & Dorsch (2007) skriver att koncentrationen av anestesisgas patienten erhåller och anestesidjupet inte enbart är beroende av inställningen av procent på förgasaren. Samma författare förklarar att faktorer såsom typ av gas och utrustning, inställningar och kalibrering av utrustningen spelar roll för vilken koncentration av anestesisgas som faktiskt administreras patienten. Med anledning av detta utfördes en utprovning i form av ett bänkttest för att studera koncentrationsökningen av isofluran i inhalationskammaren och tidsförloppet vid olika inställningar av färskgasflöden och förgasaren. Med färskgasflöde menas syrgas, eller den kombination av luft och syrgas, som tillförs patienten vid anestesi i syfte att stötta syretillförseln samt bära anestesimedlet till patienten från förgasaren.

2.7 Anestesisystem – Cirkelsystem

I denna studie användes ett cirkelsystem för anestesi. Ett cirkelsystem innebär att en viss återandning sker av utandad gas genom att den cirkulerar runt i andningssystemet i maskinen (Ehrenwerth et al. 2013). Författarna skriver även att cirkelsystem medför flera fördelar, såsom en befuktning och förvärmning av anestesisgasen som tillförs patienten, samt att lägre flöden och gaskoncentrationer krävs för att inducera och bibehålla anestesi. Att mindre anestesisgas krävs vid användning av cirkelsystem är även positivt för miljön då mindre mängd släpps ut i atmosfären (Ehrenwerth et al. 2013).

I Arbetsmiljöverkets föreskrift (AFS 2001:7) om anestesigaser samt allmänna råd om tillämpningen av föreskrifterna, står det i 6 § att arbete med anestesigas skall utföras på sådant sätt och med en sådan utrustning att så litet anestesigas som möjligt läcker ut till omgivningen vid avsedd användning.

3. Material och metod

3.1 Material

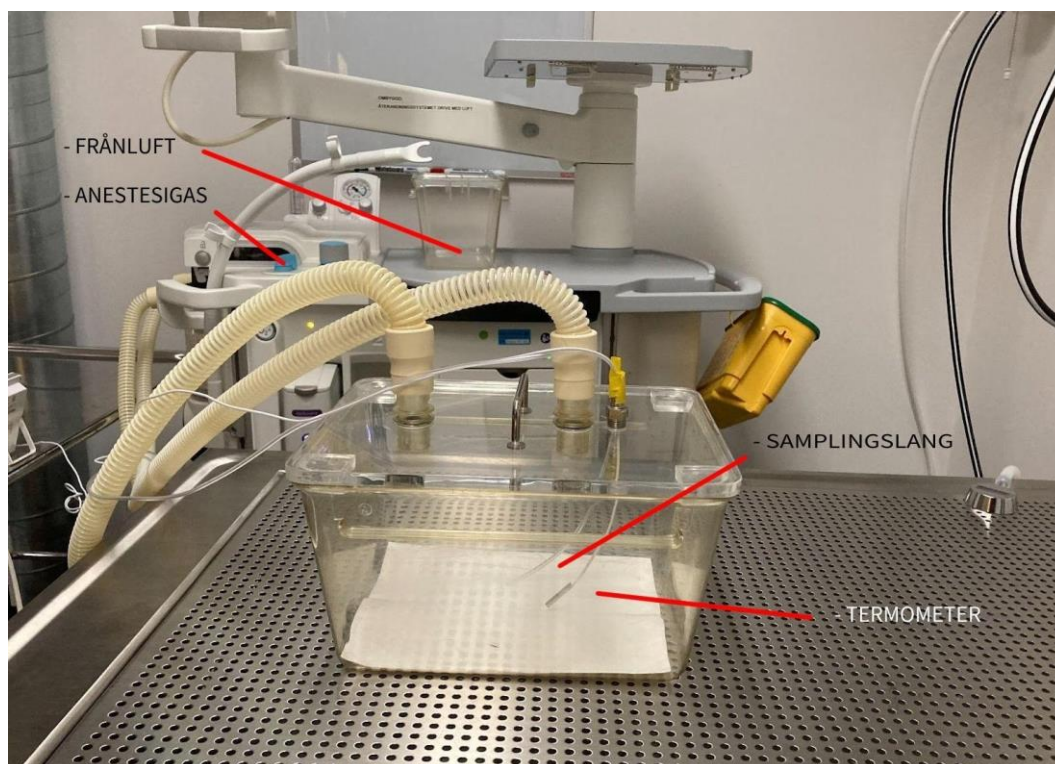
Studien omfattades av etiskt från Djurförsöksetiska nämnden i Uppsala (tillstånd Dnr 5.8.18-15533/2018). En utprovning utfördes först i form av ett bänkttest (Utprovning 1) med syfte att studera effekten i inhalationskammaren av olika färskgasflöden och inställningar på förgasaren. Därefter utfördes ett test med syfte att hitta de två kombinationer av färskgasflöden och förgasarinställning som gav snabbast induktion av anestesi med minst förekomst av excitation (utprovning 2). Dessa två kombinationer användes sedan under studien.

3.1.1 Djur och djurhållning

Råttor (n=20), *Rattus norvegicus*, tillhandahölls av Sveriges Lantbruksuniversitets (SLU) Laboratoriedjuravdelningen. Råttorna var inavlade och av stammen Wistar. Könsfördelningen var 12 honor och 8 hanar, de var födda i juli 2021 och vägde mellan 220g - 394g med en medelvikt på 288,65 g. Råttorna bodde parvis i SLUs avdelning för gnagare i plastburar (modell GM 1800 DD IVC). Två av råttorna bodde i en större modell av bur som kallas råthotell. Ljuset i lokalen där råttorna hölls släcktes kl 18:00 och tändes kl 06:00 via timer. Temperatur och luftfuktighet var 22°C respektive 75 %. Råttorna var undervisningsdjur och hanteringstränade av personal på SLU samt vid enstaka tillfällen även hanterade av studenter. Inför studien skedde ingen särskild hanteringsträning eller habituering till inhalationskammaren av råttorna. Samtliga råttor i studien sövdes endast en gång, med undantag för en råtta som sövdes två gånger på grund av tekniska problem.

3.1.2 Utrustning

En kammare (6,0 liter) i hårdplast med ett anpassat lock användes (höjd: 13,8 cm, bredd bas: 16,5 cm, bredd topp: 20,2 cm, längd bas: 21,3 cm, längd topp 26 cm). I locket gjordes tre hål. Två större för anestesisgas och frånluft samt ett mindre för samplingslang för mätning av anestesisgas och syrgas. Dessutom placerades en termometer för att mäta temperatur i kammaren. Slang och kabel fördes ner till ca 4 cm ovan golvet (Fig. 1).



Figur 1. Inhalationskammare med slangar för anestesigas och frånluft, samt samplingslang för gasmonitorering och termometer.

För att undersöka ljudnivån i inhalationskammaren vid de olika flödena placerades en decibelmätare (Quest technologies model 2400, US) ned i kammaren.

För tillförsel och monitorering av färsk- och anestesigas (isofluran, IsoFlo vet. Zoetis, Finland) användes ett anestesisystem (FLOW-i® Anaesthesia Delivery System, MAQUET Medical Systems, US) med andningsslangar 25 mm diameter.

Temperatur i kammare mättes med en separat termometer (Viking 12/213, Sverige). För uppvakning användes en plastlåda med ett gallerlock. Värmedyna med termometer (Harvard Apparatus, K 023648, US) användes för att upprätthålla och monitorera temperatur i lådan vid uppvakning. Uppvakning filmades med en mobilkamera.

3.2 Metod

3.2.1 Sökprocess

Information söktes i databaser (Web of Science, PubMed, Google Scholar och Scopus) samt i utbildningsmaterial och facklitteratur. Vid sökning i databaser användes kombinationer av bland annat sökorden anesthesia, behavior, excitement,

fresh gas, gas, induction, induction chamber, isoflurane, rat, rodent, recovery, och stress. Ytterligare litteratur hittades genom granskning av referenslistan i studierna från sökresultaten.

3.2.2 Utprovning 1, utrustning

Färskgasflödena 1, 3 och 6 l/min (100% syrgas) testades i kombination med inställningarna 3 och 5 % på förgasaren. Utprovning av utrustningen gjordes för att mäta tiden till att koncentrationen av isofluran i kammaren motsvarade inställningen på förgasaren. Varje kombination testades en gång.

Temperaturen i lådan vid de olika flödena dokumenterades. Rumstemperaturen vid bänktestet var 20,0°C. Ljudnivån i lådan mättes och dokumenterades vid respektive flöden. Frekvensinställning A och responstid slow på decibelmätaren användes vid mätning av ljudnivån.

För mätning av koncentrationen av anestesigas samt temperatur i inhalationskammaren kopplades slangar från monitorn in genom locket på kammaren. Tiden mättes tills koncentrationen av isofluran i inhalationskammaren nått koncentrationerna 3 % respektive 5 %. Om isoflurankoncentrationen i kammaren inte nådde inställningen på förgasaren noterades det högst uppmätta värdet då koncentrationen inte ökat under 3 minuter.

3.2.3 Utprovning 2, färskgasflöden och koncentration

Utifrån resultatet av utprovning 1 valdes de färskgasflöden och förgasarinställningar ut som sedan användes i utprovning 2. Då flödet 1 l/min resulterade i en lång tid för att uppnå en gaskoncentration i kammaren som anses vara adekvat för induktion av råttor exkluderades det flödet från studien.

Av de 20 tillgängliga råttorna valdes fem stycken honor slumpmässigt ut och tillfördes en av de respektive kombinationerna. Randomisering skedde i Microsoft Excel genom att råttornas nummer listades i en tabell och funktionen "Slumpmässigt intervall" användes. Fem kombinationer av flöden och förgasarinställningar testades, varav en kontroll (Tabell 1).

Tabell 1. Antal råttor samt kombination av färskgasflöden och förgasarinställningar som användes för utprovning 2

Antal råttor (n)	Färskgasflöde	Förgasarinställning
1	3 l/min	3 %
1	3 l/min	5 %
1	6 l/min	3 %
1	6 l/min	5 %
1 (kontroll)	6 l/min	0 %

Placering av anestetikammaren på dragbord märktes ut med tejp. Belysningen i försöksrummet dämpades för att efterlikna ljusstyrkan i rummet där råttorna förvarades.

Råttorna lyftes för hand ur sin bur och placerades i inhalationskammaren. Färggasflödet och förgasaren ställdes in på värdena för den aktuella råttan och en timer startades när isofluran började administreras. I kammaren levererades 100 % syrgas till råttorna inför och under induktion av anestesi. Beteenden observerades och filmades från två olika vinklar med två mobilkameror tills råttan nått medvetslöshet. Tid till medvetslöshet samt koncentration av isofluran i kammaren vid medvetslöshet observerades och dokumenterades. Råttan bedömdes i denna studie medvetslös då den förlorat sin rättningsreflex. Detta kontrollerades genom att kammaren tippades för att rulla råttan och se om den korrigerade sin position. Tippning av lådan skedde 10 sekunder efter att råttan låg avslappnat på sidan eller på bröstet med en jämn och lugn andningsfrekvens. Vid avsaknad av rättningsreflex stängdes anestesisgasen av och råttan flyttades till uppvakningslådan.

I uppvakningslådan observerades råttan och tid till vaket tillstånd dokumenterades. Råttan bedömdes som vaken då den öppnat ögonen och börjat förflytta sig i lådan. Uppvakningen filmades med mobilkamera. Förekomst av excitation vid induktion eller uppvakning observerades och registrerades.

Post-it lappar med råttornas id-nummer användes på inhalationskammaren och uppvakningslådan för att särskilja de olika individerna. Mellan råttorna rengjordes inhalationskammaren och uppvakningslådan. Först sköljdes de med kranvatten och torkades ur, därefter rengjordes de med Etanol 70 % och torkades torra.



Figur 2. Vänster: Bild på råtta i inhalationskammare. Höger: Bild på råtta i uppvakningslåda.

All hantering av råttorna skedde lugnt och varsamt för att minimera stress innan induktion och ljudnivån i rummet hölls så låg som möjligt. Vid transport mellan

försöksrum och förvaringsrum användes ett transportbord av metall med hjul och buren täcktes med en filt för att minimera stress från stark belysning.

3.2.4 Studie

Resultatet av utprovning 2 begränsade studien till att använda färskgasflöden på 3 l/min och 6 l/min och förgasarinställningen 5 %.

De resterande 15 råttorna randomiserades i tre grupper. Först randomiserades hanarna och därefter honorna (Tabell 2).

Tabell 2. Antal råttor samt kombination av färskgasflöden och förgasarinställningar som användes för i grupperna under studien

Grupp	Antal råttor (n)	Färskgasflöde	Förgasarinställning
1	5	3 l/min	5 %
2	5	6 l/min	5 %
3 (kontroll)	5	6 l/min	0 %

I de fall råttor som bodde i samma bur tillhörde samma grupp sövdes dessa efter varandra för att undvika stress orsakat av mer än en transport mellan anestesisal och förvaringsrum. Då råttorna inte tillhörde samma grupp skedde transport till och från anestesisal och förvaringsrum med båda råttorna som bodde i buren. Förberedelse av rum och utrustning samt hantering, transport och sövning av råttorna utfördes på samma sätt i studien som i utprovning 2.

Grupp 3 (kontroll) studerades först där råttornas reaktion på endast färskgasflöde undersöktes under 3 minuter. Test av kontrollgruppen skedde på förmiddagen, sövning av övriga råttor skedde på både för- och eftermiddag. Samtliga råttor förutom råtta nr 26 användes endast en gång under studien. Råtta nr 26 sövdes vid två tillfällen med fyra dagars mellanrum på grund av tekniska problem. Resultaten som redovisas för råtta nr 26 är från den andra induktionen.

Vid bedömning av antal stressbeteenden valdes beteenden ut från ett bedömningsprotokoll av Burkholder et al. (2010), dessa redovisas i Tabell 3. Det inspelade filmmaterialet granskades samtidigt av studiens två författare och antal beteenden dokumenterades. Granskningen skedde ej blindat då observatörerna var medvetna om vilken kombination av färskgasflöden och förgasarinställning råttorna exponerats för. Förekomst av excitation vid uppvakning och tid till vaket tillstånd filmades samt dokumenterades.

Tabell 3. Stressbeteenden som observerades vid granskning av inspelat material, samt definition av dessa. Modifierad från (Burkholder et al. 2010)

Beteende	Definition
Defekering	Defekerar vid induktion eller placering i kammare.
Exciterar	Excitationsfas vid induktion eller uppvak. Kastar sig med kroppen, snabba rörelser med extremiteter samt eventuell vokalisering.
Gräver	Gräver i golvet med frambenen.
Gång	Går runt i kammaren med alla fyra ben i kontakt med golvet.
Luktar/sniffar	Luktar på och undersöker omgivningen.
Putsar sig	Repetitivt slickar eller kliar sig med frambenen på huvud, ansikte eller kropp.
Skakar	Hastig rotation av huvud och kropp.
Stilla/Fryser	Står helt stilla i >2s.
Ställer sig på bakben	Reser överkroppen utan att frambenen har kontakt med underlag.
Tuggar/Gnisslar tänder	Repetitiva tuggande rörelser med munnen.
Urinerar	Urinerar vid induktion eller placering i låda.

3.2.5 Bearbetning av data och statistisk analys

Data sorterades och bearbetades i Microsoft® Excel 2016. Tid till medvetlöshet, koncentration vid inträde av medvetlöshet och antal observerade stressbeteenden analyserades med ett icke-parametriskt test, Mann Whitney U-test mellan grupperna som fick isofluran. Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$. Analysen utfördes i statistikprogrammet GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA). Data presenteras som range, medel eller median.

4. Resultat

4.1 Utprovning 1, utrustning

Uppmätt ljudnivå i inhalationskammaren under olika flöden visas i Tabell 4. Resultaten varierade från 41,4 - 62,6 dB (decibel). Ju högre färskgasflöde, desto lägre blev ljudnivån. Dessa värden går att jämföra med en normal konversation mellan två personer på 1 meters avstånd som uppgår till ca 60 dB (Trafikverket 2020).

Tiden till uppnådda koncentrationer med olika kombinationer av färskgasflöde och förgasarinställning redovisas i Tabell 4.

Tabell 4. Utprovning av utrustning. Tid till högsta uppnådda koncentration vid förgasarinställning 3 och 5 % vid färskgasflöde 0, 1, 3, och 6 l/min. Uppmätt decibel (range och medel) under påfyllnad av kammaren och temperatur i kammaren vid de olika inställningarna

Flöde:	Tid till 3 % isofluran	Tid till 5 % isofluran	Decibel range (medel)	Temperatur vid 3 % isofluran	Temperatur vid 5 % isofluran
0 l/min	-	-	59,2-62,6 (61)	-	-
1 l/min	16 min 40 s (2,8 %)	18 min 11 s (4,9 %)	46,3-52,0 (50)	19,4°C	19,5°C
3 l/min	6 min 19 s (2,8 %)	7 min 00 s	41,4-45,0 (41,5)	19,3°C	19,5°C
6 l/min	5 min 21 s	4 min 56 s	41,7-50,0 (44)	19,3°C	19,3°C

4.2 Utprovning 2, färskgasflöden och koncentration

Resultatet från utprovning 2 redovisas i Tabell 5.

Tabell 5. Resultat av utprovning 2. Råttor inducerades med isofluran. Koncentration i kammaren, tid till medvetslöshet, tid till vaket tillstånd samt förekomst av excitation dokumenterades. Råtta nr 5 var kontroll och tillfördes ej isofluran

	Kön	Flöde	Inställning förgasare	Tid till medvetslöshet	Koncentration i kammaren vid medvetslöshet	Tid till vaket tillstånd
1	♀	3 l/min	3 %	2min 52s	2,30 %	3min 45s
2	♀	3 l/min	5 %	2min 29s	4,20 %	43s
3	♀	6 l/min	3 %	2min 15s	2,70 %	25s
4	♀	6 l/min	5 %	1min 34s	4,20 %	24s
5	♀	6 l/min	0 %	-	-	-

Förekomst av excitation redovisas nedan i Tabell 6.

Tabell 6. Förekomst av excitation vid induktion och uppvakning under utprovning 2

Kombination	Excitation vid induktion	Excitation vid uppvakning
1 (n=1)	JA	JA
2 (n=1)	JA	NEJ
3 (n=1)	NEJ	JA
4 (n=1)	NEJ	JA
5 (n=1) (kontroll)	-	-
Totalt:	2	3

4.3 Studie

Kontrollgruppen uppvisade högst antal stressbeteenden under tiden i inhalationskammaren. Två stressbeteenden var unika för två olika grupper. Grävning utfördes endast av en råtta i kontrollgruppen och skakning utfördes endast av råttor i grupp 3. Det vanligast förekommande beteendet var att råttor ställde sig på bakbenen vilket förekom i samtliga grupper. Det mest ovanliga beteendet var grävning som endast utfördes av en råtta i kontrollgruppen. En sammanställning över antal beteenden i respektive grupp kan ses i Tabell 7.

Vid majoriteten av de fall då defekering och urinering kunde observeras skedde det i direkt anslutning till att råttan placerades i inhalationskammaren, redan innan anestesigasen startats.

Tabell 7. Antal råttor som utförde respektive stressbeteende i de olika grupperna under studien. Kontrollgruppen utsattes ej för isofluran. Förgasarinställning 5 % användes för grupp 1 och 2. Antal råttor per grupp var 5 stycken

Beteende	<u>Grupp 1</u> 3 l/min	<u>Grupp 2</u> 6 l/min	<u>Grupp 3</u> 6 l/min (0 %)	Summa
Defekering	0	2	1	3
Exciterar	1	2	0	3
Gräver	0	0	1	1
Gång	2	0	4	6
Luktar/sniffar	5	1	5	11
Putsar sig	2	1	4	7
Skakar	2	0	0	2
Stilla/Fryser	2	5	4	11
Ställer sig på bakben	5	5	4	14
Tuggar/Gnisslar tänder	4	1	3	8
Urinering	5	3	4	12
Totalt	28	20	30	

Fler fall av excitation kunde observeras under uppvakning än under induktion av anestesi (Tabell 8).

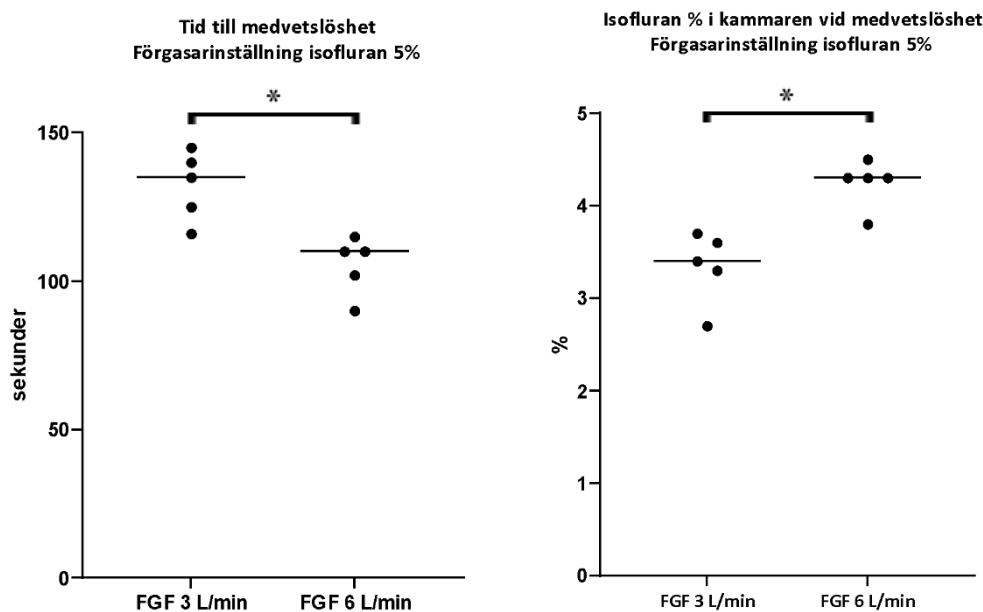
Tabell 8. Antal råttor som exciterade vid induktion och uppvakning.

Excitation	Vid induktion	Vid uppvakning
Grupp 1	1	4
Grupp 2	1	3
Grupp 3 (kontroll)	0	0
Totalt	2	7

Tiden till medvetslöshet var kortare ($p < 0,05$) för grupp 2 (range 1 min 30 s - 1 min 55 s) i jämförelse med grupp 1 (range 1 min 56 s - 2 min 25 s). Isoflurankoncentrationen vid medvetslöshet var högre ($p < 0,05$) i grupp 2 (range 3,8 % - 4,5 %) än grupp 1 (range 2,7% - 3,7 %). Den råtta som bedömdes medvetslös efter längst tid i grupp 2 (1 min 55 s) ansågs medvetslös 6 s tidigare än

den snabbaste i grupp 1 (1 min 56 s). Den längsta tiden till bedömd medvetslöshet uppmättes i grupp 1 (2 min 25 s).

Tiden till, samt koncentration av isofluran, när råttorna ansågs medvetslösa visas i Figur 3.



Figur 3. Tid till medvetslöshet (sekunder) och isoflurankoncentration (%) i kammaren vid inträffande av medvetslöshet hos råttor. FGF 3 L/min eller 6 L/min och förgasarinställning 5% isofluran. Individuella värden och median (Mann Whitney test, $*p<0,05$).

Tid till vaket tillstånd för råttorna i respektive grupp redovisas i Tabell 9.

Tabell 9. Tid tills respektive råtta uppnått vaket tillstånd efter induktion av anestesi med isofluran. Grupp 3 var kontroll och utsattes ej för isofluran.

Råtta	Kön	Flöde	Inställning förgasare	Tid till vaket tillstånd
Grupp 1:				
20	♂	3 l/m	5 %	34s
26	♂	3 l/m	5 %	4min
7	♀	3 l/m	5 %	20s
12	♀	3 l/m	5 %	40s
10	♀	3 l/m	5 %	1min 20s
Grupp 2:				
16	♂	6 l/m	5 %	3min
19	♂	6 l/m	5 %	3min 12s
27	♂	6 l/m	5 %	4 min 10s
11	♀	6 l/m	5 %	1min
13	♀	6 l/m	5 %	1min 20s

Temperaturen i kammaren vid test av grupp 1 varierade mellan 21,9°C - 22,06°C och i uppvakningslådan uppmättes en medeltemperatur på 35,5°C. Temperaturen i kammaren vid induktion av grupp 2 varierade mellan 20,4°C - 23,0°C och vid uppvakning 35,5°C - 37,0°C. Temperaturen i kammaren vid induktion av grupp 3 varierade mellan 20,9°C - 22,5°C och vid uppvakning varierade temperaturen mellan 35,5°C och 36°C.

Samtliga råttor var vid god fysisk hälsa efter att studien genomförts och bedöms ej tagit skada av försöken.

5. Diskussion

5.1 Studiens urval

Urvalet av råttor till studien begränsades till det antal råttor som fanns tillgängliga på Laboratedjursavdelningen. Ett större urval av råttor skulle eventuellt kunna ha gett ett annat resultat och visat på fler skillnader då trender till skillnader mellan grupperna kunde observeras.

Wistar är en vanligt förekommande stam inom försöksdjursverksamhet (Hedrich 2020). Detta ger studien en högre representativitet än om någon mindre vanlig ras hade använts i studien. Att råttorna är framavlade för att fysiologiskt likna varandra så mycket som möjligt (inavel) gör att risken för att resultatet varierar på grund av individuella skillnader minskar.

Metoden för randomisering av råttorna syftade till att erhålla en jämn könsfördelning mellan grupperna.

5.2 Inhalationskammaren

Utformningen av inhalationskammaren i denna studie liknade de i andra studier och läroböcker (McKelvey & Hollingshead 2003; Fuehrer 2010). Skillnaden var att kammaren i denna studie hade hål i locket för att kunna mäta isoflurankoncentration och temperatur i kammaren. Innan en inhalationskammare används i större omfattning eller produceras för försäljning bör noggranna tester av kammaren utföras för att säkerställa en jämn tillförsel av anestesigas till patienten. Då luft betar sig olika vid olika flöden och gaskoncentrationer finns risk att dödzoner uppstår i kammaren där inget luftombyte sker, vilket medför att koncentrationen av gas just där råttan befinner sig är okänd. Vid låga flöden finns även risk för kortslutning av flödet om uttag för tilluft och frånluft sitter för nära varandra (Arbetsmiljöverket 2021). Detta medför att inställningarna på anesthesiutrustningen inte överensstämmer med den mängd syre eller anestesigas som faktiskt tillförs patienten.

Placering av råttor i mindre utrymmen gav enligt Harkin et al. (2002) inte ett större stresspåslag än andra stressorer i deras studie, som till exempel smutsigt underlag, injektion och hantering. Inhalationskammarens effekt på stressnivån kan dock inte

jämföras med ovan nämnda studie då råttan i den föreliggande studien utsattes för flera stressorer samtidigt (placering i litet utrymme plus gasflöde). Detta skulle kunna ge en synergieffekt på råttans stressnivå. Vidare krävs studier som jämför induktion i inhalationskammare med maskinduktion. Vid val av metod för induktion av anestesi är det dock viktigt att eventuella ekonomiska fördelar som användande av inhalationskammare med cirkelsystem kan ge, såsom minskad användning av anestesimedel, inte väger tyngre än djurens välfärd. Då studien av Harkin et al. (2002) visade att påverkan i hemmiljö uppfattades mer stressfullt än vistelse i nya miljöer eller i begränsat utrymme, kan en rekommendation om habituering till inhalationskammaren ifrågasättas. Boulanger et al. (2015) såg i sin studie ett ökat undvikande beteende vid exponering för anestesigas hos råttor som inducerats med gas tidigare, vilket eliminerar en eventuell positiv effekt av habituering till kammaren efter första induktionen. Detta medför att habituering är mest användbart inom forskning där råttor endast skall sövas en gång. Vidare studier som undersöker effekten av habituering till inhalationskammare är välkomnat. Om dessa studier visar en positiv effekt av habituering skulle detta kunna leda till en förbättring av välfärden för djur inom forskning som endast sövs en gång. Möjligheten till habituering är oftast begränsad i kliniska situationer där djurägare kommer in med sina djur för besök och åtgärd samma dag, vilket gör att tid ofta inte finns för habituering.

5.3 Stressbeteenden

I metoddelen valdes beteenden som skulle studeras ut i förväg vilket medförde en risk att andra stressbeteenden uppvisades som inte registrerades under granskningen av materialet.

Att stressbeteenden observerades i alla tre grupper under studien tyder på att samtliga delar av studien upplevdes stressfullt och obehagligt av råttorna och inte bara själva induktionen med isofluran. Hantering och förflyttning av råttan är därför delar av anestesi som också bör tas i beaktning utöver metoden för hur anestesigasen administreras.

En liten skillnad kunde ses gällande antal uppvisade beteenden mellan grupp 1 och 2, dock utan statistisk signifikans. Studierna av Tsukamoto et al. (2015) och Tsukamoto et al. (2016) visade en förekomst av beteenden såsom urinering och defekering vid induktion med isofluran, vilket tyder på att detta kan upplevas stressande. Dock kan inga slutsatser dras utifrån vår studie huruvida en specifik kombination av koncentration och flöde resulterar i mer eller mindre stress. Eventuellt skulle skillnaden mellan grupperna bli signifikant om ett större urval användes.

I kontrollgruppen uppvisade flest råttor flera stressbeteenden under den tid de befann sig i kammaren, vilket kan tyda på att enbart befinna sig i kammaren upplevdes stressfullt. Studien av Harkin et al. (2002) menar dock att vistelse i begränsat utrymme orsakade mindre stress än andra faktorer, som till exempel förändringar i hemmamiljö eller injektioner. Att råttorna i kontrollgruppen (grupp 1) tillbringade mer tid vakna i kammaren än grupp 2 och 3 kan ha påverkat resultat då de utsattes för stressorer under en längre tid och därför hade mer tid att utföra fler beteenden. Anestesigasens hämmande effekt på det centrala nervsystemet gör det rimligt att anta att en råtta påverkad av isofluran inte har samma möjlighet att utföra synliga stressreaktioner i samma utsträckning som en opåverkad råtta.

Vid litteratursök hittades få studier som undersöker den akuta stressen och uppvisade beteenden vid induktion i inhalationskammare. Studien av Tsukamoto et al (2016) visar dock på en hög förekomst av urinering och defekering vid induktion med isofluran i inhalationskammare och kan enligt författarna tyda på stress eller obehag hos råttan. Tyvärr studeras endast förekomsten av huvudskakning, urinering och defekering i ovan nämnda studie. Det hade varit intressant att se studier som studerar fler typer beteenden kopplat till stress under induktion. Utifrån resultatet av vår studie och Tsukamoto et al (2016) kan det inte avgöras huruvida förekomsten av stressbeteenden var högt eller lågt jämfört med andra metoder av induktion av anestesi. En studie där induktion sker via exempelvis mask skulle göra det möjligt att jämföra metoderna avseende stresspåverkan hos råttorna.

Defekering och urinering var de mest förekommande beteenden som observerades hos samtliga grupper. Nämnvärt var att hos majoriteten av råttorna skedde detta i direkt anslutning till placering i inhalationskammaren. Två studier, en gjord på möss (Tsukamoto et al. 2015) samt en studie på råttor (Tsukamoto et al. 2016), såg en ökad förekomst urinering och defekering vid anestesi med endast isofluran jämfört med då premedicinering gavs. Då råttor kan markera revir genom att urinera (Gawienowski et al. 1976; Krames & Shaw 1973) skulle urinering och defekering i kammaren kunna vara ett territoriellt beteende likväl som ett stressbeteende.

I denna studie undersöktes endast tydliga stressreaktioner som utfördes med stora delar av kroppen och därför var lätta att observera. Undantaget var tuggande, som endast utförs med munnen. Detta medförde att mindre reaktioner i kroppens extremiteter samt ansiktsuttryck vilka skulle kunna tyda på stress inte undersöktes i denna studie. Harkin et al. (2002) påtalar ett behov av en ökad förståelse för hur mer subtila signaler kan påvisa stress hos råttor. Detta skulle i kombination med den typ av beteenden som studerats i denna studie ge en mer komplett bild av den upplevda stressen hos råttor under induktionsfasen.

5.4 Excitation

Studien visade inte på några större skillnader mellan grupperna som utsattes för isofluran gällande förekomsten av excitation under induktionen. De olika tiderna till medvetslöshet mellan grupp 1 och 2 resulterade inte heller i någon skillnad gällande förekomsten av excitation i uppvakningen. Totalt exciterade nio råttor vid induktion eller uppvak. Av dessa nio råttor exciterade två vid induktion (en från varje grupp) och sju vid uppvak, vilket förtydligar vikten av ett anestesi-protokoll som tar hänsyn till välfärden även vid uppvaket. Att ingen skillnad kunde ses mellan grupperna gör kommande studier med gasanestesi där premedicinering ingår intressanta då premedicineringens effekt på excitationen kan studeras. Studien av Tsukamoto et al. (2015) tyder på att premedicinering kan ha positiva effekter även för uppvaket, förutom att det kan minska förekomsten av excitation vid induktionen. Även om det inte studerades i större utsträckning i denna studie kan resultatet från utprovning 2 tyda på att låga förgasarinställningar bör undvikas då bägge råttorna som inducerades med förgasarinställningen 3 % exciterade vid induktion.

5.5 Flöden och Koncentrationer

Ett tydligt samband kunde ses mellan mängden färskgasflöde en råtta fick och tiden det tog för råttan att nå medvetslöshet. Det högre flödet resulterade i en snabbare induktion, men reducerade inte risken för excitation i uppvaket. Råttorna i grupp 1 som fick det lägre flödet tog längre tid på sig att nå medvetslöshet än råttorna i grupp 2. Grupp 2 hade även en signifikant högre koncentration av isofluran i kammaren när de ansågs medvetslösa jämfört med grupp 1. Även om studien fokuserade på induktionen av anestesi noterades att tiden det tog att återgå till vaket tillstånd var dock längre för grupp 2 som fick det högre färskgasflödet jämfört med grupp 1.

Särskilt inom forskning som involverar försöksdjur är det rimligt att anta att tiden för induktion är en viktig faktor vilken då riskerar att ställas mot råttornas välmående. Enligt lag skall dock stort fokus läggas på djurens välmående och det är därför önskvärt att metoder utvecklas som uppfyller både kravet på låg stress samt en snabb och kontrollerad induktion. Vid vissa djurförsök används stora antal råttor vilket kan skapa en situation där man inte kan monitorera råttan vid uppvakning. I dessa fall finns risk att råttans välmående prioriteras ner i syfte att spara på en begränsad tid. Det är inte ovanligt att råttorna som sövs inom djurförsök avlivas innan de har vaknat ur narkosen. I dessa fall skulle användandet av ett högre färskgasflöde och förgasarinställning kunna vara positivt ur tidsaspekten då studien tyder på att det leder till en snabbare induktion utan skillnad i antal uppvisade stressbeteenden. Då råttorna avlivas utan att vakna riskerar de inte att utsättas för en eventuell stress under uppvakning.

Samtliga mätningar av isoflurankoncentrationen visade koncentrationen i kammaren och inte den alveolära koncentrationen i råttan. För att mäta den alveolära koncentrationen skulle mätningar med kapnograf kopplad direkt till råttans utandningsluft ha krävts. Att uppnå en nivå av isofluran i en råtta som leder till medvetslöshet kan alltså gå snabbare genom att använda andra metoder, exempelvis med mask, då inhalationskammaren inte behöver fyllas med gas. Vi kan med denna studie säga vilka gaskoncentrationer i kammaren som krävdes för att en råtta skulle nå medvetslöshet, men inte hur mycket anestesigas som faktiskt har administrerats till råttan då det tar tid för koncentrationen i lådan att stiga till inställt värde.

Vid exponering för färskgasflöde kunde råttorna uppvisa ett beteende där de står helt stilla. I denna studie kallas detta beteende för frysning och definierades som att råttan stod stilla i över två sekunder utan att röra någon kroppsdel. De grupper som exponerades för det högre färskgasflöde visade mer av detta beteende. Både grupp 1 och 3 visade en högre frekvens av detta beteende än grupp 2 som utsattes för ett lägre färskgasflöde. Harkin et al. (2002) såg i sin studie bland annat ökad hjärtfrekvens och ett immobilatoriskt beteende hos råttor som utsattes för en kort och kraftig luftpuff. Vad som orsakade frysning i vår studie är oklart, men utifrån ovan nämnda studie är en teori att råttan upplever den plötsliga höjningen av luftflöde obehaglig. En annan förklaring kan vara en lättare chockreaktion på grund av den plötsligt upplevda sänkning temperaturen som kommer i samband med ökning av flödet. Girling (2013) skriver att temperaturen i en rattas bur bör vara mellan 18°C och 26°C. Det är rimligt att anta att temperaturen i färskgasflödet uppfattas lägre än luften i kammaren då vind eller fläkt har en kylande effekt på bar hud (Statens meteorologiska och hydrologiska institut 2010). Samtidigt som flera stressbeteenden kunde observeras då råttan exponerades för färskgasflödet sågs även piloerektion i flera av fallen. Detta kan vara ett fysiologiskt svar från råttan i syfte att behålla värme nära kroppen men kan även vara en reaktion efter att ha blivit skrämmd (Coleman 2015). Vi valde att inte använda piloerektion som en stressmarkör då vi ej kunde bekräfta denna reaktion på det inspelade materialet.

5.6 Klinisk signifikans

Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan grupp 1 och 2 gällande antal uppvisade stressbeteenden, varför inga slutsatser kan dras som kan ge direkta fördelar i den kliniska verksamheten. Resultatet från utprovning 1 tydliggör dock vikten av att personalen på en operationsavdelning är väl bekant med sin utrustning och vilken effekt olika inställningar har. Vid låga flöden och förgasarinställningar tog det lång tid att uppnå vad som anses vara adekvata nivåer av isofluran i inhalationskammaren för att resultera i medvetslöshet hos råttan. Detta i kombination med att många stressbeteenden kunde ses i kontrollgruppen tyder på

att tiden råttan spenderar i inhalationskammaren bör minimeras för att minska den upplevda stressen. Utan kunskap om hur den inhalationskammare kliniken använder sig av fylls med gas vid olika flöden och förgasarinställningar finns risk att råttan utsätts för mer stress än nödvändigt. Korrekta flöden och inställningar på förgasaren kan även minska användandet av syrgas och anestetika vilket är positivt för kliniken ur en ekonomisk synpunkt samt ur miljöperspektiv. Storleken av de positiva effekterna för ekonomin och miljön påverkas dock av storleken på inhalationskammaren. En större kammare kräver rimligtvis mer anestetika och ett högre färskgasflöde för att fyllas med anestesigas inom samma tidsintervall som en mindre kammare. Verksamheten bör därför anpassa storleken på inhalationskammaren efter storleken på sina patienter för att kunna spara in på anestesimedel.

5.7 Studiens begränsningar

I denna studie konstaterades endast om ett beteende utfördes eller inte. Då ingen studie hittades vid litteratursökning som graderar stressbeteenden kan inget sägas om huruvida en typ av beteende är resultatet av en högre upplevd stress än ett annat. För korrekt bedömning av stressnivån hos råttor krävs studier som graderar olika stressbeteenden. Studier av sådant slag är ett komplext arbete som med stor sannolikhet är väldigt tids- och resurskrävande. Resultatet skulle dock vara mycket värdefullt för djurvälståndet då de kan bidra till att skapa stressskalor för att tolka akut stress hos råttor. Dessa skalor skulle kunna appliceras i flera olika situationer som kan antas vara stressfulla för råttor för att på ett mer exakt sätt utvärdera stressnivån.

Att observatörerna inte var blindade vid granskning av filmmaterialet var en nackdel i studien då det skulle givit ett mer objektivt resultat samt minskat risken för bias. Studien medgav dock inte för möjligheten att ta in ny personal och låta dem granska materialet då detta är ett kandidatarbete med begränsade resurser samt tidsram. Trots att det kan ske omedvetet anses bias i detta fall varit lågt då det inte förelåg något egenintresse hos någon av observatörerna av att se ett visst resultat i studien.

6. Konklusion

Utifrån denna studie kan inga slutsatser dras vad gäller vilken kombination av färskgasflöde och isoflurankoncentration som genererar minst stress hos råttor vid induktion i inhalationskammare. Eventuellt skulle studier med ett större urval av råttor kunna påvisa en signifikant skillnad. Mycket tyder dock på att flöden under 3 l/min och en inställning på förgasaren med isofluran under 3 % bör undvikas. Låga flöden och förgasarinställningar ger en långsam fyllning av anestesigas i kammaren vilket skulle kunna resultera i en ökad förekomst av excitation.

Tid till medvetslöshet vid förgasarinställningen 5 % var signifikant kortare vid 6 l/min än vid 3 l/min och tyder på att ett högre färskgasflöde ska användas om en snabb induktion är önskvärd. Färskgasflödet 6 l/min resulterade i en högre koncentration av isofluran i kammaren då råttan bedömdes medvetslös jämfört med flödet 3 l/min. Ingen signifikant skillnad kunde dock ses gällande antal uppvisade stressbeteenden mellan de två färskgasflödena och inget kan därför sägas om vad som är bäst för råttan med hänsyn till upplevd stress.

Framkallandet av stressbeteenden hos gnagare kopplat till induktion i inhalationskammare med isofluran har studerats i begränsad omfattning. Ytterligare studier på ämnet behövs för en ökad förståelse för hur färskgasflöde, koncentrationer av anestesigas samt tid till medvetslös påverkar råttor vid anestesi.

Referenser

- Arbetsmiljöverket (2021). *Allmänventilation*. <https://www.av.se/inomhusmiljo/luft-och-ventilation/allmanventilation/> [2021-03-28]
- Arbetsmiljöverket (2001). Arbetsmiljöverkets föreskrifter om anestesigaser samt allmänna råd om tillämpningen av föreskrifterna. (2001:7). Stockholm: Sveriges Riksdag
- Balla, D.Z., Schwarz, S., Weisner, H.M., Henninge, A.M. & Pohmann, R. (2014). Monitoring the stress-level of rats with different types of anesthesia: A tail-artery cannulation protocol. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 70 (1), ss. 35-39.
DOI: [10.1016/j.vascn.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.03.003)
- Bodelsson, M., Lundberg, D., Roth, B., Werner, M. (2005). Anestesi i praktiken. I: Bodelsson, M (red) *Anesthesiologi*. 2 uppl, Studentlitteratur. ss 147-160.
- Burkholder, T., Niel, L., Weed, J., Brinster, L., Bacher, J., Foltz, C. (2010). Comparison of Carbon Dioxide and Argon Euthanasia: Effects on Behavior, Heart Rate, and Respiratory Lesions in Rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 49 (4), ss. 449-450.
- Boulanger B.J., Nemeth, G., Makowska, I.J. & Weary, D.M. (2015). Rat aversion to sevoflurane and isoflurane. *Applied Animal Behaviour Science*. 164, ss. 73-80.
DOI: [10.1016/j.applanim.2014.12.013](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.12.013)
- Cazakoff, N., Brittany., Johnson, J.K., Howland, G.J. (2010) Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent behavioural and pharmacological findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 34 (5), ss. 733-741.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.002>
- Coleman M., A. (2015) *A Dictionary of Psychology*. 4th Edition, Oxford: Oxford University Press
- Davis, J., Caro, A., Spears, S. & Sharp, J. (2015). Response to Protocol Review Scenario: Chamber is preferred. *Lab Animal*. 44 (257)
DOI: [10.1038/labam.800](https://doi.org/10.1038/labam.800)
- Dorsch, J. A., & Dorsch, S. E. (2007). *Understanding anesthesia equipment* 5th Edition, Baltimore: Williams & Wilkins. ss. 503, 508-516, 528-534, 3468, 3484.
- Ehrenwerth, J., Eisenkraft, J.B. & Berry, J.M. (2013). *Anesthesia equipment: principles and applications*. Second edition. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders

- European Commission (2021). *Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018*. ((SWD(2021)204). Bryssel: Europa Kommissionen.
https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD_%20part_A_and_B.pdf
- Fornes, S. (2010) Induction Drugs. I: Bryant, S (red.) *Anesthesia for Veterinary Technicians*. Ames, IA: Blackwell Publishing. s. 157.
- Fuehrer, L. (2010) Induction Drugs. I: Bryant, S (red.) *Anesthesia for Veterinary Technicians*. Ames, IA: Blackwell Publishing. s. 144.
- Girling, S. (2013). *Veterinary Nursing of Exotic Pets*. 2 uppl, Chichester: John Wiley & sons, Ltd. ss. 26-35.
- Harkin, A., Connor, T.J., O'Donnell, J.M. & Kelly, J.P. (2002). Physiological and behavioral responses to stress: what does a rat find stressful? *Lab Anim (NY)*, 31 (4), ss. 42–50.
 DOI: <https://doi.org/10.1038/5000150>
- Harris, B.S.R. (2014) Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 308, ss. 250-265
 DOI: 10.1152/ajpregu.00361.2014
- Hedrich, J. H. (2020) Taxonomy and Stocks and Strains. I: Suckow, A. M., Hankenson, C. F., Wilson, P. R., Foley, L. P. (red.) *The Laboratory Rat*. Third Edition. Hannover, Germany: Academic Press. ss. 47-75.
 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814338-4.00002-7>
- Heffner, H. Heffner, R. Contos, C. & Ott, T. (1994). Audiogram of the hooded Norway rat. *Hearing research*. Vol. 73(2). ss. 244-247.
- Herrmann K, Flecknell P. (2019). Retrospective Review of Anesthetic and Analgesic Regimens Used in Animal Research Proposals. *Altex-Altern Anim Ex*. 36 (1), ss. 65-80.
 DOI: [10.14573/altex.1804011](https://doi.org/10.14573/altex.1804011)
- Jordbruksverket (2022). Det här är 3R. <https://jordbruksverket.se/djur/ovriga-djur/forsoksdjur-och-djurforsok/sveriges-3r-center/det-har-ar-3r#h-Forfattningar> [2022-04-27]
- Koolhaas, JM., Meerlo, P., DeBoer, S.F., Strubbe, J.H., Bohus, B. (1997). The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience & Biobehavioral reviews*. 212 (6), ss. 775-782.
 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00057-7)
- Longley, L. (2008). *Anaesthesia of Exotic Pets*. Elsevier Saunders Ltd. ss. 63-66.
- Marquardt, N., Feja, M., Hünigen, H., Plendl, J., Menken, L., Fink, H. & Bert, B. (2018). Euthanasia of laboratory mice: Are isoflurane and sevoflurane real alternatives to carbon dioxide? *PloS one*. 13 (9).
 DOI: [10.1371/journal.pone.0203793](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203793)
- McKelvey, D. & Hollingshead, K.W. (2003). *Veterinary anesthesia and analgesia*. 3. ed. St. Louis, Missouri: Mosby. s. 56.

- Ries, R. C., Azmudéh, A., Franciosi, G. L., Schwarz, K. W. S., MacLeod, A. B. (1999) Cost comparison of sevoflurane with isoflurane anesthesia in arthroscopic meniscectomy surgery. *Canadian Journal of Anesthesia*. 46. ss 1008-1013.
DOI: [10.1007/BF03013193](https://doi.org/10.1007/BF03013193)
- Statens meteorologisk och hydrologiska institut (2010). *Vindens kyleffekt*.
<https://www.smhi.se/kunskapsbanken/meteorologi/vind/vindens-kyleffekt-1.259>
[2022-03-29]
- Sturman, O., Germain, P.-L. & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. Amsterdam, Netherlands), 21(5), ss.443–452.
DOI: 10.1080/10253890.2018.1438405
- Thomas, A. J., & Lerche, P. (2017) *Anesthesia and Analgesia for Veterinary Technicians*. Fifth Edition, St. Louise, Missouri: Elsevier. s. 161, 174.
- Trafikverket (2020) *Mått på ljudnivåer*. <https://www.trafikverket.se/for-dig-i-branschen/miljo---for-dig-i-branschen/buller-och-vibrationer---for-dig-i-branschen/Fakta-om-buller-och-vibrationer/matt-for-ljudnivaer/> [2022-03-21]
- Tsukamoto, A., Ilmuro, M., Sato, R., Yamazaki, J., Inomata, T. (2015) Effect of midazolam and butorphanol premedication on inhalant isofluran anesthesia in mice. *Experimental Animals*. 64 (2). ss 139-145.
DOI: [10.1538/expanim.14-0073](https://doi.org/10.1538/expanim.14-0073)
- Tsukamoto, A., Uchida, K., Maesato, S., Sato, R., Kanai, E. & Inomata, T. (2016). Combining isoflurane anesthesia with midazolam and butorphanol in rats. *Experimental animals*, 65 (3), ss. 223–230.
DOI: 10.1538/expanim.15-0113

Tack

Först och främst vill vi tacka vår handledare Anneli Rydén för all vägledning vi har fått genom arbetets gång, samt personalen på Laboratoriedjursavdelningen för stöd med lokal, utrustning och råttor. Ett tack riktas även till Patricia Hedenqvist för hjälp vid delar av studiens praktiska moment samt medlemmarna i skrivgruppen för värdefull respons.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.