

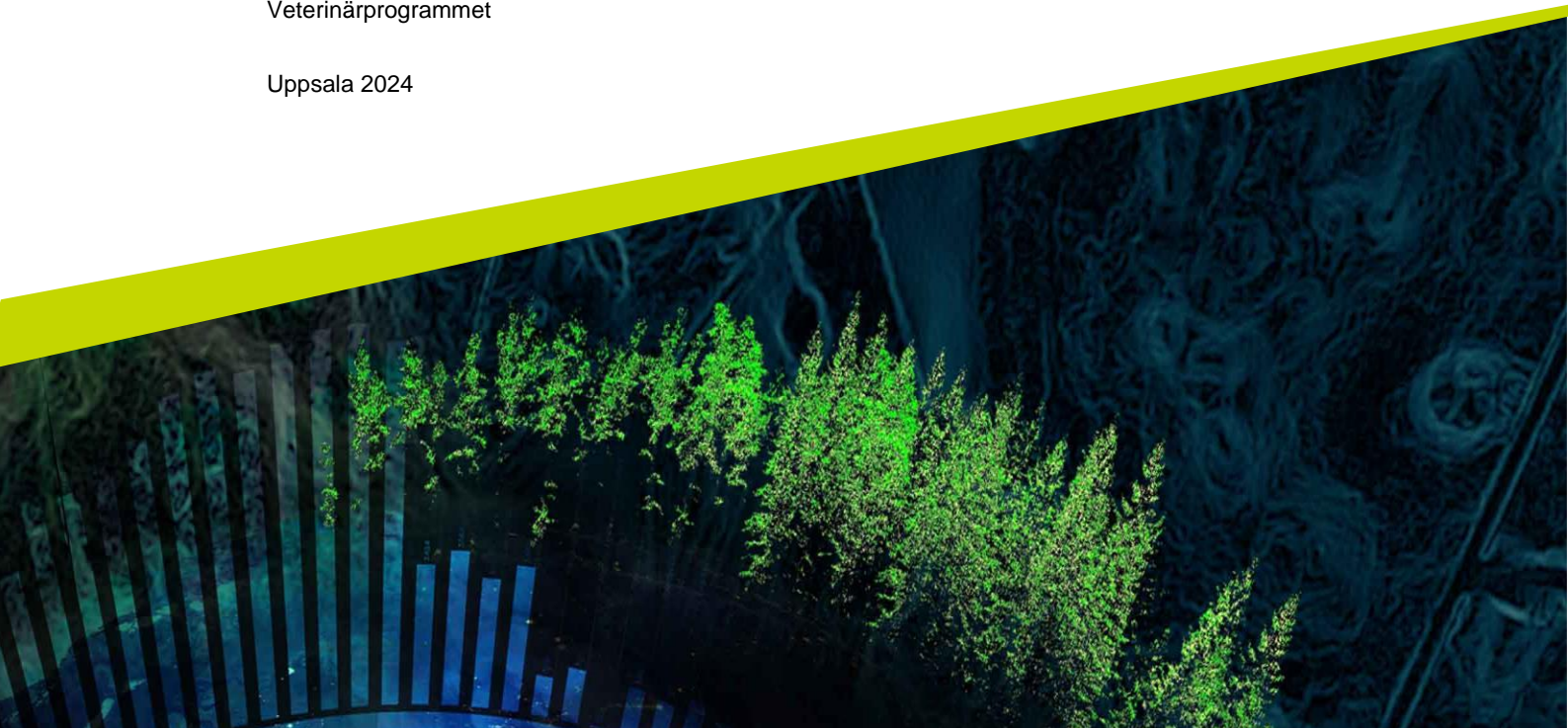


Har minimal postnatal hantering av möss effekt på rädsla efter avvänjning?

Julia Lundkvist Lestander

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2024



Har minimal postnatal hantering av möss effekt på rädsla efter avvänjning?

Does brief postnatal handling of mice reduce fear after weaning?

Julia Lundkvist Lestander

Handledare:	Patricia Hedenqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Elin Spangenberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2024
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	Postnatal hantering, Approachtest, Open-field-test, Emotionalitet, BALB/c

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Postnatal hantering av möss och råttor är en välstuderad behandling vilket primärt påverkar djurens stresshantering. De påföljande effekterna resulterar i både fysiologiskt och psykiskt mätbara skillnader mellan behandlande djur och kontroldjur. Fysiologiska effekter av behandlingen inkluderar lägre nivåer av ACTH och kortikosteron när mössen utsätts för stressituationer. Psykiska skillnader innefattar ett förändrat beteende där mössen är mindre emotionella och mer explorativa i nya situationer; de uppvisar mindre tecken på rädsla. Detta är väldigt positivt för djurvälståndet och ger potentiellt mer pålitliga forskningsresultat än från stressade och rädda djur.

Postnatal hantering innebär att musungar hanteras dagligen innan avvänjning. Det finns ingen vedertagen tidslängd på behandlingen eller den tid som djuren ska hanteras per dag. Då det finns en uppsjö av studier på ämnet, förekommer det även många olika förfaranden. Vanligtvis brukar dock hanteringen påbörjas efter musungars första levnadsvecka och den dagliga hanteringstiden överstiga 3 minuter. Postnatal hantering innebär vanligtvis att ungarna separeras från sin moder och placeras i en annan bur. Efter en viss tid har passerat återförenas de i sin hembur. Effekten av postnatal hantering är troligen maternellt medierad eftersom honan efter separation ägnar extra mycket tid till ungarna. Som regel lämnas kullen ifred under första levnadsveckan eftersom störningar riskerar leda till kannibalism.

Denna studies syfte var att undersöka om de psykiska effekterna av postnatal hantering kunde erhållas trots en minimal behandlingstid av musungar i väldigt ung ålder, samt utan att honan stressades till kannibalism. Tio kullar och totalt 54 möss ingick i studien. Före födslarna vandes alla honor vid försöksledarens närvaro genom att handen stoppades ner i buren under två minuter per dag under 13 dagar. Musungarna i försöksgruppen hanterades från dag ett efter deras födsel och fortsatte hanteras de sju påföljande dagarna. Hanteringen innebar att musungarna ströks försiktigt med två fingrar över kroppen i två minuter per dag medan de låg kvar i boet. Modern var kvar i buren under tiden. Efter behandlingstidens slut lämnades de ostörda fram till avvänjningen. Ungarna i kontrollgruppen lämnades ifred.

Samma dag som avvänjningen och under de två påföljande dagarna testades mössen i två olika approachtest och open-field för att utvärdera deras respons på stress. Approachtestet i samband med avvänjningen visade att de djur som ingick i försöksgruppen var signifikant mindre rädda för en hand som stoppades ner i buren. Detta beteende var dock unikt för approachtest I. De båda andra testerna visade ingen signifikant skillnad mellan försöksgruppen och kontrollgruppen i emotionalitet eller explorativitet.

Det finns olika möjliga förklaringar till varför resultaten skiljde sig åt mellan testerna. En anledning kan vara att den postnatala hanteringen i denna studie skiljde sig från de flesta studier om postnatal hantering. En annan möjlighet är att i approachtest I testades mössen i grupp; i de två andra testerna var de ensamma. Den slutsats som går att dra av denna studie är att minimal neonatal hantering av musungar under den första levnadsveckan är tillräckligt för att minska rädsla vid avvänjning men inte nog för att öka det explorativa beteendet eller reducera rädsla dagarna därpå.

Nyckelord: Postnatal hantering, Approachtest, Open-field-test, Emotionalitet, BALB/c

Abstract

Postnatal handling of mice and rats is an extensively researched treatment which primarily affects the animals stress management. The subsequent effects result in both physiological and psychological measurable differences between treated and control animals. Physiological effects of the treatment include lower level of ACTH and corticosterone when the mice are put in a stressful situation. Psychological differences include an altered behavior where the mice are less emotional and more explorative in new situations; they show less signs of fear. This is very positive for animal welfare and potentially provides more reliable study results than those from stressed and fearful animals.

Postnatal handling means that mice pups are handled daily before weaning. There is no generally accepted length of time that the treatment should last or the amount of time the animals should be handled daily. Because there is a plethora of studies on the subject different methods are not uncommon. However, the handling usually begins after the mice pups' first week in life and the daily handling surpasses three minutes. Postnatal handling normally means that the pups are separated from their mother and placed in another cage. After a certain amount of time has passed, they're reunited in their home cage. The effect of postnatal handling is probably maternally mediated since the female spends more time with her pups following separation. As a rule, the litter is left alone during the first week of the pups' lives since disturbances to the nest or home cage risks leading to cannibalism.

This study's purpose was to investigate if the psychological effects of postnatal handling could be obtained despite a minimal treatment time of the mice pups at a very young age, and also without stressing the mother into cannibalistic behavior. Ten litters and a total of 54 mice were included in the study. Before the parturition the females were habituated to the handler's presence by placing a hand in the cage for two minutes per day for 13 days. The mice pups in the treatment group were handled from day one after their birth and continued being handled the seven consecutive days afterwards. The handling consisted of the mice pups being stroked gently with two fingers over the body for two minutes per day while they were still in the nest. The mother was in the cage during the handling. After the treatment was over, they were left alone until the day of weaning. The pups in the control group were left alone.

The same day as weaning and the two consecutive days afterwards the mice were tested in two different approach tests and open field to evaluate their response to stress. The approach test in connection with the weaning showed that the animals that were a part of the treatment group were significantly less afraid of a hand that was placed in the cage. This behavior was, however, unique for approach test I. The two other tests showed no significant difference between the treatment group and the control group when it came to emotionality and being explorative.

There are different possibilities as to why the results differed between the tests. One reason could be that the postnatal handling in this study differed from most others studies on postnatal handling. Another possibility is that in approach test I the mice were tested as a group; in the two other tests they were alone. The conclusion that can be drawn from this study is that minimal neonatal handling of mice pups in the first week of life is enough to reduce fear at weaning but not enough to increase explorative behavior or reduce fear in the days following.

Keywords: Postnatal handling, Approachtest, Open-field-test, Emotionality, BALB/

Innehållsförteckning

1. Inledning	9
2. Litteraturoversikt	11
2.1 Postnatal hantering	11
2.2 Prenatal stress	12
2.3 Approachtest	12
2.4 Open-field-test	13
2.4.1 Explorativt beteende i open field test	15
2.5 Vikt	15
2.6 Perinatal död	16
2.7 Välfärd	16
Material och metod	18
2.8 Djur och inhysning	18
2.9 Prenatal maternell hantering	18
2.10 Postnatal hantering	20
2.11 Approach test	20
2.12 Open-field-test	22
2.13 Vägning	23
2.14 Statistisk analys	24
3. Resultat	25
3.1 Studiepopulation	25
3.2 Approachtest I	25
3.3 Open-field-test	26
3.4 Approachtest II	30
3.5 Vikt	32
4. Diskussion	34
4.1 Approachtest I	35
4.2 Open-field-test & approachtest II	36
4.3 Övriga tester	37
4.4 Studiedesign	38
4.5 Vidare forskning	39
4.6 Konklusion	39

Referenser	40
Populärvetenskaplig sammanfattning	46
Tack	48

1. Inledning

Husmusen (*Mus musculus*) är det vanligaste försöksdjuret i biomedicinsk forskning (Hickman *et al.* 2017). Trots att denna användning av musen sträcker sig mer än ett århundrade tillbaka i tiden (Bonhomme & Orth 2017) finns det ännu inget vedertaget tillvägagångssätt när det kommer till hantering av musungar inom den första levnadsveckan (Whitfield *et al.* 2019). Det är generellt rekommenderat att modern ska lämnas ifred veckan före partus för att reducera stress och postnatalt ska modern och hennes ungar ej störas under ungarnas första levnadsvecka. I de fall neonatala möss inte lämnas ifred finns det en ökad risk för kannibalism av ungarna (Burn & Mason 2008) eller att ungarna överges av modern (Whitfield *et al.* 2019). Oberoende av detta faktum är det inte en praxis som alltid kan efterföljas då det finns ett behov för studier på neonatala möss.

Postnatal hantering – vilket vanligen innebär att musungarna eller råttungarna separeras från modern och placeras i en egen bur under en tidsperiod – har dock inte enbart negativa effekter (Levine *et al.* 1967; D’Amato *et al.* 1998). Råttor och möss som hanteras i tidig ålder är mer explorativa och mindre emotionella. De hanterar även stress bättre än ohanterade djur (Meaney *et al.* 1996). Dessa och fler positiva effekter har i tidigare studier uppnåtts genom hantering över ett flertal veckor (Levine *et al.* 1967), under ett tidsspänn på 15 minuter per dag under en kortare tidsperiod (Meaney *et al.* 2000) eller en kombination av båda (Meaney *et al.* 2008). Effekten tros dock vara maternellt medierad (Liu *et al.* 1997; D’Amato *et al.* 1998).

Emellertid genomförde Pongrácz & Altbäcker (1999) en studie där neonatala kaniner enbart hanterades i tre minuter per dag under den första levnadsveckan och resultatet påvisade signifikant skillnad mellan hanterade och ohanterade djur där hanterade var betydligt mindre rädda för människor. Detta är ett väldigt positivt resultat då en reduktion av rädsla hos försöksdjur ökar välfärden för djuren (Podberscek *et al.* 1991). Försöksdjursmedicin ska även följa 3R principen där välfärd är en viktig komponent (Arck 2019).

Den här studien syftar till att undersöka om minimal hantering av musungar under den första levnadsveckan är tillräckligt för att minska rädsla och öka explorativt

beteende i samband med och efter avvänjning och på så sätt utforska om Pongrácz & Altbäcker (1999) resultat går att replikera på möss.

2. Litteraturoversikt

2.1 Postnatal hantering

Majoriteten av all litteratur på effekten av postnatal hantering använder råttor som modell (Meaney 2001). Emellertid finns det studier som bevisar att möss uppvisar samma typ av respons på hantering som råttor (Zaharia *et al.* 1996; Meaney 2001). Detta innefattar även open-field beteende (Drai *et al.* 2001).

Postnatal hantering, även kallad "early handling", innebär mestadels att ungarna och modern separeras och flyttas till var sin bur under ett antal minuter vilket kan variera alltifrån tre (Levine 1957) till 15 (Meaney *et al.* 2008). Emellertid finns det också studier där råttor får elchocker (Ader & Grota 1969), möss lyfts upp och hålls i handen (Clausing *et al.* 1997) och där kaniner endast vidrörs i boet (Csatádi *et al.* 2005). Hanteringen kan pågå i sju dagar (Meaney & Aitken 1985) och upp till tre veckor (Meaney *et al.* 2008) och kan påbörjas samma dag som råtten föds.

Effekten av hanteringen är djupgående; den påverkar råtten både fysiskt och psykiskt under hela dess livstid (Meaney *et al.* 1991). Ett exempel är att vuxna råttor som har hanterats i tidig ålder har lägre nivåer av hormonerna ACTH och kortikosteron (primär glukokortikoid hos gnagare) när de utsätts för diverse stressorer jämfört med vuxna råttor som ej har hanterats postnatalt (Meaney *et al.* 1996). Även deras stressnivåer reduceras snabbare. Ytterligare ett exempel är att hanterade råttor binder signifikant mindre kortikotropinfrisättande hormon (CRH), vilket i sin tur reglerar nivån av ACTH (Plotsky *et al.* 2005). De blir heller inte lika stressade i okända situationer (Núñez *et al.* 1996). De får också ett bättre minne (Plescia *et al.* 2014) vilket kvarstår i hög ålder (Meaney *et al.* 1991); de är även mer aktiva i open-field (Levine *et al.* 1967). Bland möss har samma typ av beteendeförändringar observerats med en ökning av det explorativa beteendet och en minskning av emotionalitet (D'Amato *et al.* 1998).

Ett intressant fenomen är det faktum att effekten kan förvärfas genom ett flertal olika metoder (Ader & Grota 1969). En råtta som utsätts för elchocker i tre minuter erhåller samma effekt av sänkt respons till stressorer som en råtta som lyfts upp och hålls i handen i tre minuter. Däremot finns det skillnader mellan könen.

Postnatalt hanterade råtthanar har lägre nivåer av kortikosteron vid akut stress än postnatalt hanterade honor (Meaney *et al.* 1991). Honorerna har samma nivå av kortikosteron som ohanterade honor under tiden stressmoment pågår. Däremot när

stressmomentet är avklarat sjunker kortikosteronet till basalnivåer signifikant snabbare hos hanterade honor vilket det även gör hos hanterade hanar.

Det finns två teorier om vad det egentligen är som driver den postnatala effekten (Denenberg 1999):

1. Effekten är medierad genom ändringar i det maternella beteendet mot avkomman i respons till hantering.
2. Effekten är medierad genom hantering.

Enligt Liu *et al.* (1997) spenderar råtthonor till postnatalt hanterade ungar mer tid på att slicka och putsa dem. Hanungar blir dock mer omhändertagna än honungar (Hao *et al.* 2011). Frekvens av omsorg har en signifikant korrelation med mängden plasma ACTH och kortikosteron i den vuxna avkomman (Liu *et al.* 1997). Desto högre frekvens av omsorg som utövades postnatalt desto lägre blev nivåerna av ACTH och kortikosteron i respons till en stressituation.

D'Amato *et al.* (1998) studie stödjer också teorin att effekten är maternellt medierad. I studien blev mushonor behandlade med ett anxiolytikum i samband med att deras ungar separerades från dem. Vid återföreningen med ungarna uppvisad honorna ett förändrat maternellt beteende med mindre responsivitet till sina ungar. Detta resulterade i att den vuxna avkomman inte uppvisade den förväntade minskningen av emotionalitet.

2.2 Prenatal stress

Moderns omgivning under dräktigheten påverkar utvecklingen av fostret hos råttor och har även en inverkan på open-field beteendet (Abramova *et al.* 2021). Prenatal stress resulterar i en minskning av explorativt beteende och en ökning av emotionalitet hos avkomman (Lehmann *et al.* 2000). Enligt Wakshlak & Marta (1990) kan effekten dock fullständigt reverseras av neonatal hantering.

Även hos möss har man sett en tydlig förändring där musungar som föds av prenatalt stressade honor blir eftersatta i utvecklingen med bland annat nedsatta reflexer och en fördröjning i fysisk mognad (Meek *et al.* 2000).

2.3 Approachtest

Approachtest, vilket även kan kallas "human approachtest" (Augustsson *et al.* 2002) är ett redskap för att bedöma djurs rädsla för människor utifrån det beteende

de uppvisar efter att en människa har närmat sig (de Passillé & Rushen 2005). Testet utgår från premissen att de djur som är mer rädda kommer att hålla ett större avstånd. Råttan placeras i ett begränsat utrymme tillsammans med en passiv hand (Augustsson *et al.* 2002; Cloutier *et al.* 2012). Tiden det tar för råttan att vidröra handen för första gången, även kallat latens, och antalet gånger den vidrör handen är två vanliga variabler att mäta (Augustsson *et al.* 2002). Csatádi *et al.* (2005) fann i sin studie på kaniner att även ohanterade ungar vidrörde handen, dock mestadels bara en gång.

Vuxna råttor som har hanterats innan testet interagerar med handen mer än de råttor som ej har hanterats (Cloutier *et al.* 2012). Positiv hantering, såsom att leka med råttor, är mest effektivt för att reducera rädsla. Råttor kan känna igen och skilja på människor och är mer villiga att närma sig, för dem, kända människor. Kaniner som har hanterats postnatalt, även under en väldigt begränsad tid, är mindre rädda för människor (Pongrácz & Altbäcker 1999; Csatádi *et al.* 2005).

2.4 Open-field-test

Open-field-testet uppfanns 1934 (Hall 1934) och är en av de vanligaste metoderna för att utvärdera emotionalitet hos möss (Seibenhener & Wooten 2015). Det är en modell som kan användas för att studera rörelsemönster och explorativt beteende för att sedan göra en bedömning om musens emotionella tillstånd (Gould *et al.* 2009). Det finns en uppsjö av parametrar som kan analyseras i testet, alltifrån aktivitetsnivå till stereotypa beteenden. Dessa parametrar är väldefinierade vilket möjliggör för en enkel bedömning av utföraren av testet (Seibenhener & Wooten 2015).

Open-field-testet är enkelt att genomföra och kräver ingen tidigare träning av mössen (Seibenhener & Wooten 2015). Under testtiden filmas musen med en videokamera och rörelsemönstret analyseras sedan manuellt eller med tracking software (Gould *et al.* 2009). Mössen som ska ingå i försöket ska flyttas till försöksrummet för aklimatisering minimum 30 minuter innan testet påbörjas (Seibenhener & Wooten 2015). Därefter kan testet inledas genom att en mus placeras i hörnet (Shoji & Miyakawa 2019) eller i mitten av en okänd, tom inhägnad där den är fri att röra sig över hela området (Seibenhener & Wooten 2015). Dess enda begränsning är väggarna som inhägnaden består av. Testarenan, som vanligen består av en låda (Kraeuter *et al.* 2019), kan vara olika utformad (Võikar & Stanford 2023). Det finns cirkulära, rektangulära och kvadratiska inhägnader där rektangulära och kvadratiska utformningar förekommer mer frekvent än cirkulära, mest troligt för att de är enklare att konstruera. Dock har de nackdelen att mössen föredrar att sitta i hörnen och uppvisar mindre explorativt beteende än de möss som testas i

en cirkulär låda. Någon standardisering av storleken på testområdet existerar inte; minimimått på 40 x 40 cm (Gould *et al.* 2009) och 30 x 30 cm (Vöikar & Stanford 2023) finns beskrivet. En större yta är rekommenderad vid studier på explorativt beteende då det gör det lättare att upptäcka om musen undviker den centrala zonen (Vöikar & Stanford 2023). Väggarna på inhägnaden ska vara tillräckligt höga för att förhindra att musen hoppar ut. Lådan bör vara tillverkad i ett material som är lätt att rengöra då den ska desinficeras med 70 % etanol mellan varje mus för att eliminera doftspår (Kraeuter *et al.* 2019). Försöksrummets belysning är en viktig faktor (Gould *et al.* 2009). Ljuskällan får ej vara placerad på ett sådant sätt att det kastar skuggor i lådan då detta kan påverka musens beteende (Vöikar & Stanford 2023). Även styrkan på ljuset har en inverkan (Eilam 2004). Starkt ljus har en kraftigt hämmande effekt på aktivitet hos möss och påverkar även rörelsemönstret med en ökning av tigmotaxis. Vid studier på explorativt beteende ger svagt ljus bättre förutsättningar. Låga omgivningstemperaturer ger ingen påverkan på beteende förutsatt att de inte utsätts för det längre än sex timmar (Hu *et al.* 2022).

Testtiden ligger inom ett stort spann (Vöikar & Stanford 2023). Historiskt sett genomförs open-field-testet mellan fem till tio minuter (Gould *et al.* 2009) men det kan pågå upp till 90 minuter (Vöikar & Stanford 2023). Tiden på dygnet som musen testas spelar en roll i vilka beteenden som uppvisas (Bodden *et al.* 2019). Det är essentiellt att alla möss testas samma tid. Försöksledaren får ej vara synlig för musen under tiden då detta kan influera beteendet (Seibenhener & Wooten 2015); inga ljud eller rörelser bör heller förekomma (Gould *et al.* 2009) Detta kan bland annat uppnås genom att försöksledaren lämnar rummet under tiden. När open-field-testet är avslutat och musen flyttas från lådan bör den placeras i en ny bur i stället för dess hembur för att undvika att den influerar de möss som den bor med och som ännu ej har testats (Gould *et al.* 2009). Vid upprepning av open-field-testet med en mus som redan genomgått det resulterar det i lägre aktivitetsnivåer (Nagy & Glaser 1970).

Unga möss är mindre aktiva än äldre möss i open-field test (Nagy & Glaser 1970) och spenderar mindre tid i det centrala området (Shoji & Miyakawa 2019). Könet kan möjligtvis också påverka, vilket har visats på råttor, där vuxna råtthanar demonstrerar ett mer emotionellt beteende än råtthonor; de undviker den centrala zonen, utövar mer tigmotaxis och är mindre aktiva (Knight *et al.* 2021).

I de studier där flera olika testmetoder används kan vilken ordning metoderna kommer i influera resultatet av open-field-test (Blokland *et al.* 2012). Vanligtvis utförs testerna i turordning från minst invasivt till mest invasivt. Likaså vardagliga stressmoment, däribland burbyte, bör undvikas ett dygn innan för att förhindra eventuell påverkan på mössen (Gould *et al.* 2009)

2.4.1 Explorativt beteende i open field test

När möss introduceras i en ny miljö förflyttar de sig främst längst med väggarna (Drai *et al.* 2001). Detta beteende kallas tigmotaxis och är ett tecken på emotionalitet hos möss (Leppänen & Ewalds-Kvist 2005). Allt eftersom de gradvis utforskar miljön etablerar de en hemmabas dit de återvänder till (Drai *et al.* 2001). Från hemmabasen gör mössen exkursioner perifert som gradvis förlängs för att sedan röra sig mer centralt. Mössens aktivitet är låg till att börja med för att successivt öka under testets tidsgång. BALB/c möss följer tydligt detta mönster (Fonio *et al.* 2012). Under de första 30 minuterna uppvisar de ett starkt undvikande beteende i att utforska hela open-field-området.

Det existerar många olika parametrar som tillämpas i open-field-testet, bland annat graden av tigmotaxis, graden av aktivitet och latens till första kontakt med den centrala zonen (Knight *et al.* 2021). Tiden som musen spenderar i centrumet av inhägnaden är en av de allra vanligaste parametrarna att mäta (Vöikar & Stanford 2023). Vid ökad stress kommer musen uppvisa en ökad grad av tigmotaxis och en sänkning av aktivitet, latens till första kontakt med den centrala zonen och tiden den spenderar i den centrala zonen (Knight *et al.* 2021). En ökad grad av defekation, som ett tecken på emotionalitet, är omdiskuterad (Seibenhener & Wooten 2015). Trots det kan det ändå vara en användbar parameter (Levine *et al.* 1967; Lester 1968)

2.5 Vikt

Födelsevikten på nyfödda möss kan påverkas redan innan partus (Grimm & Frieder 1987) och sedermera resultera i en lägre vikt vid avvänjning (Lehmann *et al.* 2000). På råttor har man observerat att när dräktiga honor utsätts för stress, både kronisk (Cabrera *et al.* 1999) och mer akut (Barlow *et al.* 1978), resulterar det i lägre födelsevikt hos avkomman. Ungarna ökar inte heller lika mycket i vikt efter partus och detta leder till en lägre avvänjningsvikt (Lehmann *et al.* 2000). Denna effekt är bibehållen i minst fem månader efter födseln. Vardagliga situationer såsom att buren hanteras triggar en stressrespons hos gnagare (Gärtner *et al.* 1980). Samtidigt visar Peters *et al.* (2002) studie att daglig inspektion av buren och boet inte ger någon signifikant skillnad gällande avvänjningsvikt.

Kullstorleken påverkar födelsevikten där ungar som föds i större kullar väger mindre och ungar som föds i mindre kullar väger mer (Reading 1966). Kulleffekten, vilket är att möss som är födda i samma kull är fenotypiskt mer lika varandra än möss från andra kullar trots att de tillhör samma genetiskt identiska stam, redogör för 63,7 % av variation i kroppsvikten. (Jiménez & Zylka 2021). Det har uppmärks-

sammats på råttor att ungar som hanteras postnalt kan uppnå en högre avvänjningsvikt (Levine 1957) men det har även visats att detta inte alltid stämmer (Pryce *et al.* 2001).

2.6 Perinatal död

Perinatal död, det vill säga dödsfall som uppstår under sen dräktighet och upp till en vecka efter partus, är ett bevisat stort problem hos försöksmöss (Weber *et al.* 2013a). I en studie observerades en total mortalitet för hela kullens bortgång på 20 % bland BALB/c möss. Problemet är mångfacetterat och kan uppstå på grund av en mängd olika orsaker, däribland vilken typ av miljö honorna föder sina ungar i och om de utsätts för stress. Elwood (1991) tar upp att det hos gnagare kan finnas en ökad risk för kannibalism av kullen om boet eller ungarna vidrörs vilket bevisas i Burn & Mason (2008) studie på råttor om frekvens av burbyte och dess inverkan på kannibalism. Vid mer frekventa burbyten observerades en ökning av antalet ungar som försvann och antalet föräldrapar som utförde beteendet. Kannibalism var den vanligaste dödsorsaken hos ungarna i studien. Emellertid uppmärksammar Weber *et al.* (2013b) studie att kannibalism ej behöver föregås av att ungen dödas av modern utan enbart att honan äter upp kroppen.

Huseringen av honorna har ingen signifikant påverkan på ungarnas mortalitet (Heiderstadt *et al.* 2014). De kan bo tillsammans med andra honor eller hållas enskilda. Huruvida honorna är primipara – förstföderskor – eller multipara – flerföderskor har ingen effekt på mortaliteten (Weber *et al.* 2013a).

2.7 Välfärd

Rädsla för människor utgör ett problem för djurvälferden inom försöksdjursmedicin (Podberscek *et al.* 1991). Hantering av djur, däribland möss, är dock en nödvändig del av studier (Hurst & West 2010). Detta betyder emellertid inte att hantering i sig är negativt då en kontinuerlig hantering av möss leder till minskad rädsla i interaktioner med människor och även i nya stressituationer.

Möss är flyktdjur (Hickman *et al.* 2017) och därmed väldigt stresskänsliga för förändringar i deras miljö (Gärtner *et al.* 1980). Även råttor är flyktdjur (Anderson *et al.* 2021) och enbart genom att flytta på en rattas bur, utan att ta av locket eller röra vid rattan, sker en ökning av bland annat kortikosteron och rattan får även takykardi som varar i minst tio minuter. I det fall locket öppnas ökar adrenalinnivån i rattans plasma och blir tre gånger så hög (Kvetnansky *et al.* 1978). Fångas rattan in och

lyfts upp ökar adrenalinnivån upp till sju gånger. Stress kan även interferera med pålitligheten på studier som utförs på råttor (Shyu *et al.* 1987).

Ett flertal studier på kaniner har bevisat att det inte krävs någon markant investering av tid för att reducera rädsla (Pongrácz & Altbäcker 1999; Cloutier *et al.* 2012). Neonatala ungar kan vid rätt förutsättningar behöva så lite som fem sekunder interaktion per dag för att ge resultat (Csatádi *et al.* 2005).

Material och metod

2.8 Djur och inhysning

Tolv honliga primipara möss (*Mus musculus*) av stammen BALB/c i genomsnittsåldern 114 dagar som var uppfödda på Sveriges lantbruksuniversitets försöksdjursavdelning i Uppsala placerades i par tillsammans med en hanlig mus av stam BALB/c. De inhystes i sex stycken IVC GM500 (Tecniplast, Buguggiate, Italien) burar (38 x 19 x 13 cm) med foder (Ssniff, Soest, Tyskland) och vatten *ad libitum*. Bottenmaterialet bestod av aspsån (Safe Select Fine, JRS, Rosenberg, Tyskland). Burarna var inredda med ett kartonghus, tre stycken Play Tunnels (Datesand, Manchester Storbritannien), ett hus (Smart Home, Datesand, Manchester Storbritannien), en bitpinne (Aspen Brick, Datesand, Manchester Storbritannien) och ett ark cellstoff som bomaterial, se *figur 1*. Genomsnittlig temperatur i rummet var 22,8 °C. Genomsnittlig luftfuktighet var 49,9 %. Antal ljusa timmar var tolv (kl 6:00 – kl 18:00) och antal mörka timmar tolv (kl 18:00 – kl 06:00).



Figur 1. Inredd IVC-gruppbur med en hane (synlig) och två honor.

2.9 Prenatal maternell hantering

Hantering av honorna påbörjades dagen efter att de hade placerats tillsammans med hanen. Mellan klockan 8:00 – 10:00 utfördes hanteringen genom att en hand placerades i ena änden av buren och hölls stilla under två minuter, se *figur 2*. Under tiden var alla tre möss fria att interagera eller undvika handen. Efter två minuter togs handen bort och buren stängdes. Detta upprepades under tretton dagar. Alla honor, både försöksgrupp och kontrollgrupp, hanterades. All hantering av de vuxna

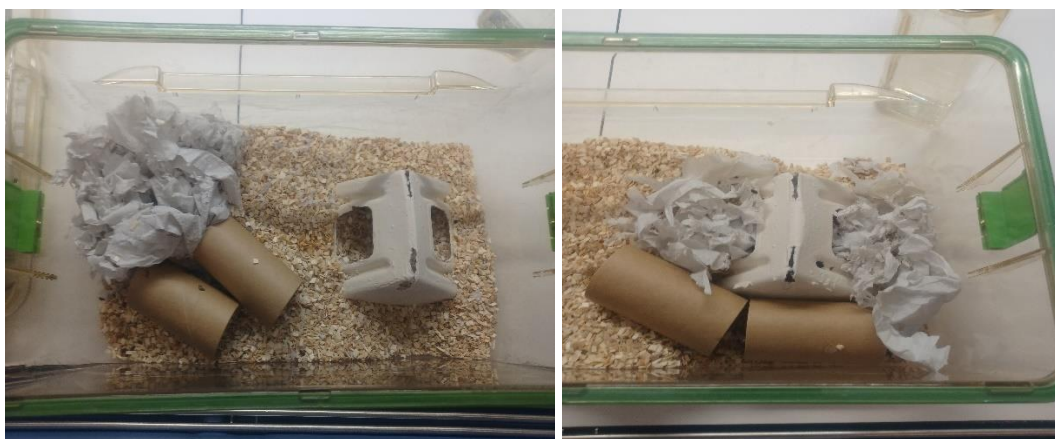
mössen och deras ungar utfördes av en och samma person. Detta utfördes för att minska risken för kannibalism efter partus.



Figur 2. Mushonor under pågående hantering.

På den 14:e dagen separerades mössen. Honorna placerades i enskilda IVC GM500 burar inredda med ett Smart Home, en Aspen Brick, två Play Tunnels och ett ark cellstoff som bomaterial. Bottenmaterialet och fodret ändrades ej från den gemensamma avelsburen till den separata. Foder- och vattentillgång var *ad libitum*. Åtta av burarna placerades i rad sju i burställningen (DGM rack, Tecniplast, Buguggiate, Italien); fyra placerades i rad sex.

Dagen efter att honorna hade flyttats till separata burar påbörjades burkontroller. Detta utfördes både på försöksgruppen och kontrollgruppen. Varje dag, fram till den enskilda honan födde, togs buren fram och inspekterades. Detta innebar att boet som honan hade byggt försiktigt öppnades och undersöktes för att upptäcka eventuella ungar. Då honorna byggde bo på olika platser i buren och i varierande grad innebar det att vissa honor fick sina bon mer störda än andra, se *figur 3*; se *figur 4*.



Figur 3. Enskild bur. Bo byggt utanför Smart Home. Figur 4. Bo byggt inuti Smart Home

2.10 Postnatal hantering

Honan lämnades ifred under det första dygnet efter partus. Hanteringen påbörjades dagen därpå och pågick fram till dag sju efter partus och avslutas därefter. Musungarna som ingick i försöksgruppen hanterades i två minuter dagligen mellan klockan 8:00 – 10:00 under deras första levnadsvecka. Under dessa två minuter ströks hela kullen försiktigt med två fingrar i boet, se *figur 5*. Honan var kvar i buren under tiden. Efter en veckas tid så lämnades försöksgruppen ifred fram till avvänjningen förutom vid burbyte vilket skedde en gång. De musungar som ingick i kontrollgruppen hanterades aldrig innan avvänjningen förutom vid burbyte vilket skedde en gång innan avvänjning. Försöksgruppen och kontrollgruppen var slumpmässigt utvalda med Microsoft Excel. Ingen kullutjämnning skedde mellan grupperna. Två bortfall skedde under studien. En hona i försöksgruppen blev ej dräktig och en hona i kontrollgruppen fick missfall.



Figur 5. Moder och musungar i försöksgrupp under pågående hantering.

2.11 Approach test

Två approachtest genomfördes.

Det första testet utfördes mellan klockan 8:00 – 09:00 dag 21 efter partus i samband med avvänjningen. Approachtestet påbörjades med att all inredning plockades ut ur hamburen. Därefter placerades en hand med handflatan uppåt i ena änden av buren under en minut, se *figur 6*. Musungarna och mushonan var fria att interagera eller inte interagera med handen. Efter 60 sekunder hade passerat flyttades musungarna över till sin nya bur genom att försiktigt lyftas upp med händerna. Hela testet filmades fram till att den sista ungen hade flyttats. Den nya buren innehöll samma bottenmaterial och samma foder som i buren ungarna föddes i. Inredningen bestod av ett Smart Home, tre Play tunnels, en Aspen brick och ett ark cellstoff som bomaterial. Tillgång på foder och vatten var *ad libitum*.

Videorna analyserades av försöksledaren som var blindad för gruppstillhörighet med reservation för en bur som tillhörde kontrollgruppen då försöksledaren kände igen antalet möss vilket var unikt för den buren.

De två parametrarna som analyserades var:

- Antalet beröringar av handen dividerat med antalet möss i buren – beröring definierat som att en mus, dock ej modern, synligt och med uppsåt vidrörde handen antingen med nosen eller minst en tass. Beröringar utom synhåll, såsom bakom handen, räknades ej. Vid de tillfällen musen enbart rörde vid handen med kroppen för att passera förbi räknades ej detta som ett besök. Om musen valde att ta minst ett steg tillbaka men sedan ändrade sig och tog fysiskt kontakt igen räknades detta som en ny beröring. Om en mus vidrörde armen av försöksledaren räknades det ej som en beröring.
- Latens till första kontakt – definierat som tiden innan den första musen, dock ej modern, har berört handen.



Figur 6. Moder och musungar under pågående approachtest I.

Det andra approachtestet utfördes mellan klockan 8:00 – 10:00 dag två efter avvänjningen när mössen var 23 dagar gamla. Mössen placerades en och en i en öppen, oinredd bur (38 x 19 x 13 cm). En hand med handflatan uppåt placerades i ena änden av buren, se *figur 7*. Musen var fri att interagera eller inte interagera med handen. Efter 60 sekunder togs handen bort och musen flyttades tillbaka till sin hembur. Hela testet filmades.

Filmerna analyserades av försöksledaren som var blindad för gruppstillhörighet förutom att en bur.

De två parametrarna som analyserades var:

- Antalet beröringar av handen – definierat som att musen synligt och med uppsåt vidrörde handen antingen med nosen eller minst en tass. Beröringar utom synhåll, såsom bakom handen, räknades ej. Vid de tillfällen musen enbart rörde vid handen med kroppen för att passera förbi räknades ej detta som ett besök. Om musen valde att ta minst ett steg tillbaka men sedan ändrade sig och tog fysiskt kontakt igen räknades detta som en ny beröring. Om musen vidrörde armen av försöksledaren räknades det ej som en beröring.
- Latens till första kontakt – definierat som tiden innan musen har berört handen.



Figur 7. Mus under pågående approachtest II.

2.12 Open-field-test

Testet utfördes mellan klockan 8:30 – 11:30 dag ett efter avvänjningen när mössen var 22 dagar gamla. 30 minuter innan testet påbörjades flyttades mössen i sin hembur till försöksrummet för acklimatisering. En ram med måtten 60 x 56 x 16 cm av ljusgrå plast placerades på en arbetsbänk. Rummet var indirekt upplyst med en skrivbordslampa som var riktad mot taket. Ljusnivån var 8,7 lux i arenan. Rums-temperaturen var 19 grader Celsius. Testet filmades med en webbkamera (Logitech, Lausanne, Schweiz) som var placerad 106 cm ovanför inhägnaden. Vid teststarten plockades en mus slumpmässigt ut från dess hembur, antingen med händer eller med kartongrör; därefter placerades musen längst upp i det högra hörnet sett från webbkamerans synvinkel. Den lämnades sedan i inhägnaden i tio minuter, se *figur 8*; försöksledaren lämnade rummet under tiden. Efter att tio minuter hade passerat gick försöksledaren in i rummet igen och fångade in musen, antingen med händer eller med kartongrör. Musen placerades därefter i en ny bur i försöksrummet. Inhägnaden rengjordes med 70 % etanol mellan varje mus. När alla möss hade genomgått testet placerades de tillbaka i sin hembur.

Filmerna bedömdes blindat av försöksledaren. Open-field-området delades in i fyra kvadranter på 30 x 28 cm. Den centrala zonen var 30 x 28 cm (50 % av området). De fyra parametrarna som analyserades var:

- Antalet korsningar över kvadranter – definierat som alla fyra tassar har passerat över kvadrantlinjen, dock ej svans.
- Antal besök i den centrala zonen – definierat som alla fyra tassar placerade inom linjerna för den centrala zonen, dock ej svans. Om testobjektet lämnade den centrala zonen med minimum en tass men sedan valde att vända tillbaka in i den centrala zonen med alla fyra tassar inom linjerna igen räknades detta som ett nytt besök.
- Duration i den centrala zonen – den totala tiden testobjektet spenderade inom den centrala zonens linjer med alla fyra tassar, dock ej svans.
- Mängden avföring – räknad i antal feces-pellets producerade under testet



Figur 8. Mus i open-field-test.

2.13 Vägning

Vägningen utfördes mellan klockan 08:00 – 10:00 dag två efter avvänjningen när mössen var 23 dagar gamla och genomfördes efter det andra approachtestet. Musungarna placerades en och en i en tom bur (38 x 19 x 13 cm) ovanpå en våg. Vikten registrerades och ungarna placerades tillbaka i sin hembur efteråt.

2.14 Statistisk analys

Statistiska analyser genomfördes i InVivoStat, version 4.7. Ett icke-parametriskt test, Mann-Whitney, tillämpades för jämförelser mellan försöksgrupp och kontrollgrupp då alla parametrar som undersöktes, förutom en, inte bestod av kontinuerliga data. Den enda parametern som bestod av kontinuerlig data och var normalt fördelad enligt Shapiro-Wilk var vikt (g) vilket analyserades med unpaired t-test. Signifikansgränsen sattes till $p < 0.05$ på båda testerna.

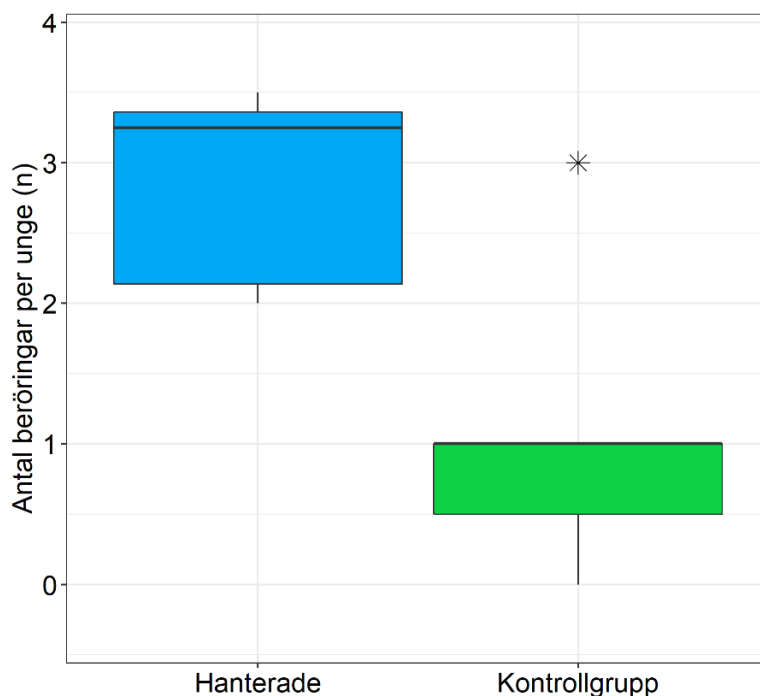
3. Resultat

3.1 Studiepopulation

Den hanterade populationen, det vill säga försöksgruppen, bestod av 32 möss ($n = 32$). Kontrollgruppens population bestod av 22 möss ($n = 22$). Tillsammans ingick 54 möss i studien. I försöksgruppen var antal ungar per kull 7, 4, 6, 4 och 11 och i kontrollgruppen 6, 6, 1, 7 och 2. I open-field-testet uppstod ett bortfall i försöksgruppen då en video blev korrumpad. I det andra approachtestet uppstod två bortfall, ett i försöksgruppen och ett i kontrollgruppen, då båda mössen hoppade ut ur buren under tiden testet pågick.

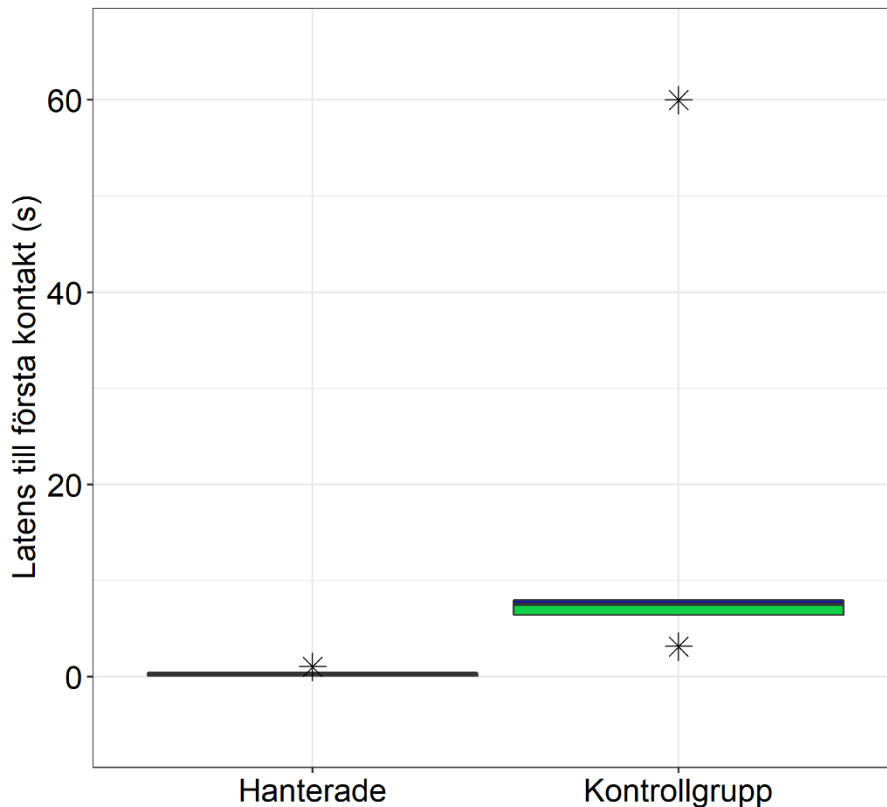
3.2 Approachtest I

Vid jämförelse av medelvärdet av antal beröringar mellan grupperna fanns det en signifikant skillnad då $p=0,0361$ vilket innebär att de hanterade djuren vidrörde försöksledarens hand vid signifikant fler tillfällen än kontrollgruppen, se *figur 9*.



Figur 9. Antal beröringar per unge i kontrollgruppen respektive den hanterade gruppen. Låd-diagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrårslinjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnan representerar ett värde som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P < 0,05$.

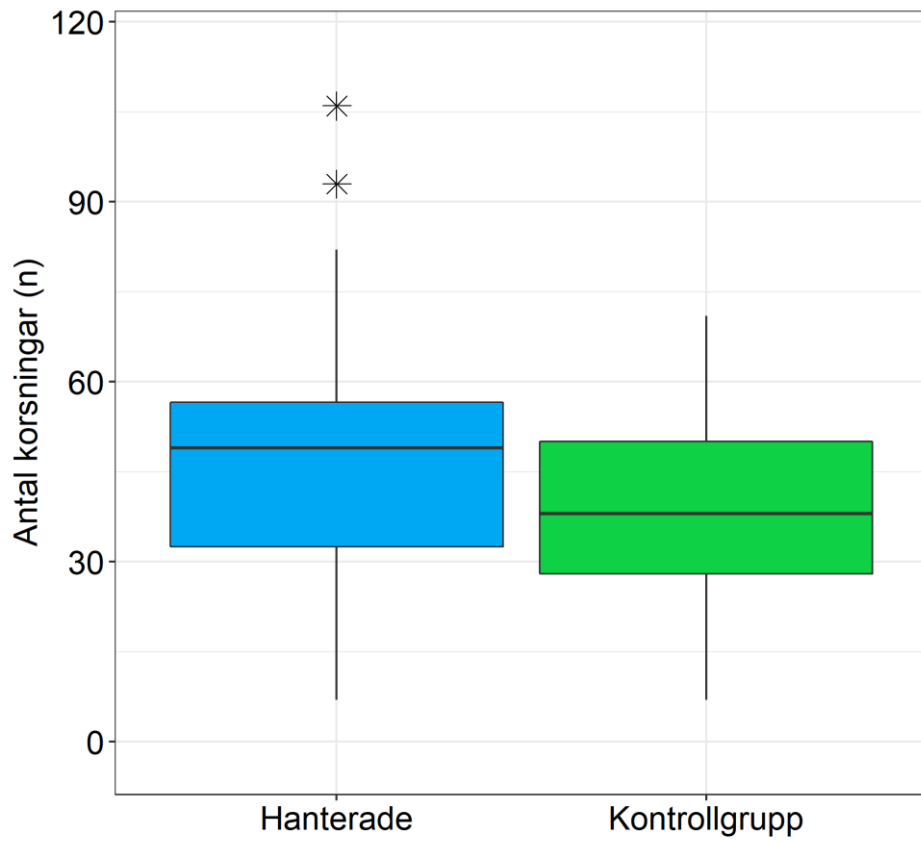
När latens till första kontakt jämfördes fanns det en signifikant skillnad mellan grupperna då $p=0,0119$. Djuren som hade hanterats var betydligt snabbare på att vidröra handen till skillnad från kontrollgruppen, se *figur 10*.



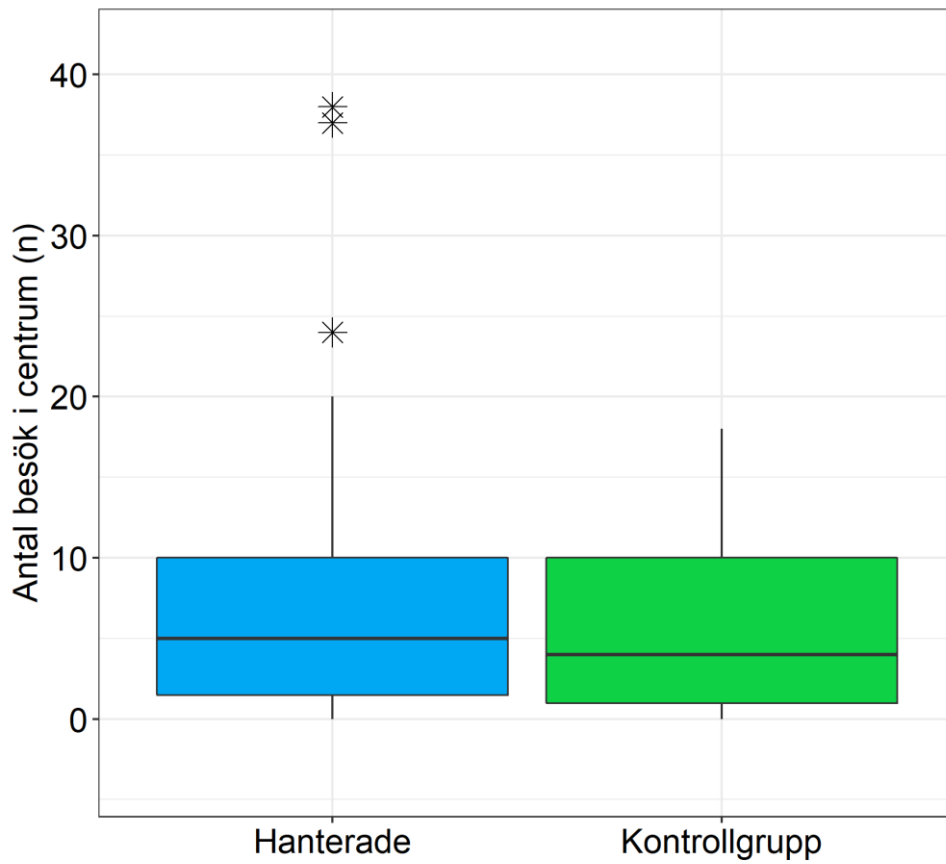
Figur 10. Latens till första kontakt i den hanterade gruppen respektive kontrollgruppen. Låd-diagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Stjärnorna representerar latensvärden som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P<0,05$.

3.3 Open-field-test

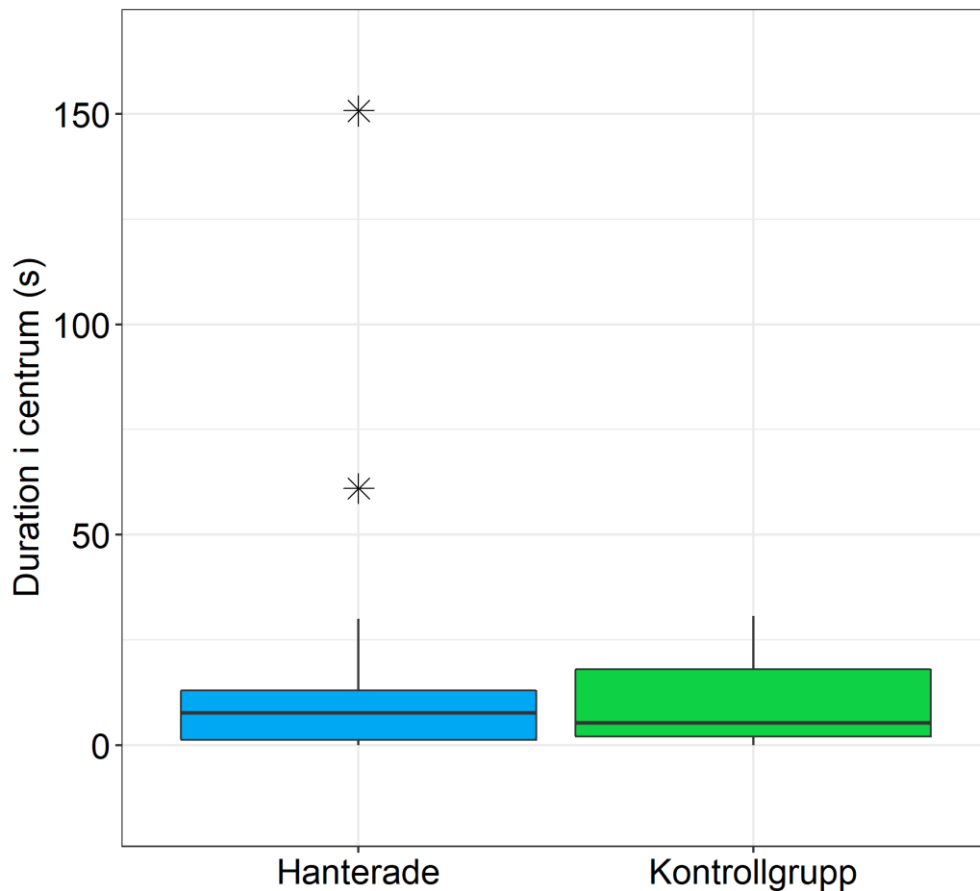
Antal korsningar, se *figur 11*, antal besök i centrum, se *figur 12*, och duration i centrum, se *figur 13*, hade alla p-värden som översteg 0,05, vilket innebar att det därmed ej fanns någon statistiskt signifikant skillnad mellan de båda grupperna. De hanterade djuren uppvisade inte ett mer explorativt beteende eller en minskning av emotionalitet i open-field.



Figur 11. Antal korsningar i kontrollgruppen respektive den hanterade gruppen. Låddiagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrhårs-linjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnorna representerar värden som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P > 0,05$.

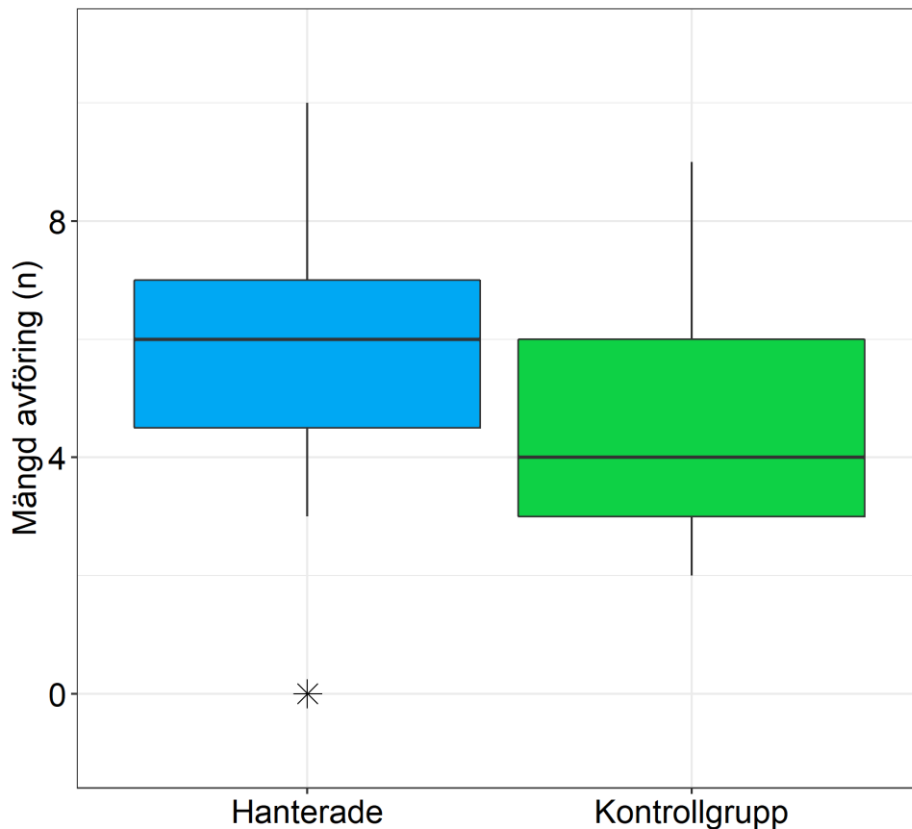


Figur 12. Antal besök i centrum i den hanterade gruppen respektive kontrollgruppen. Låddiagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morr-hårslinjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnorna representerar värden som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P > 0,05$.



Figur 13. Duration i centrum i den hanterade gruppen respektive kontrollgruppen. Låddiagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrhårslinjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnan representerar ett värde som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P > 0,05$.

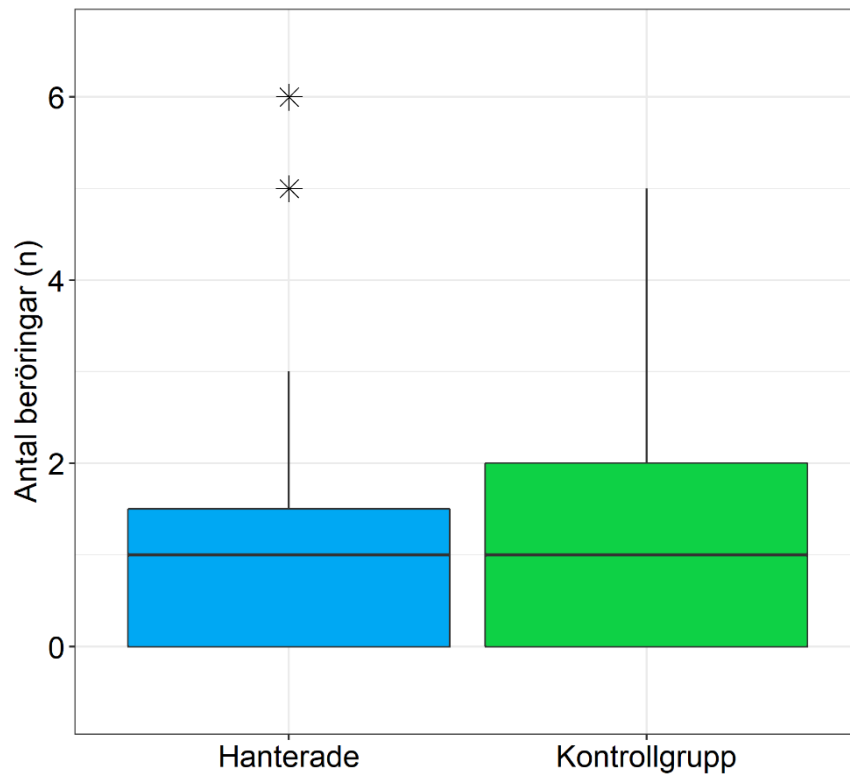
Mängden avföring hade däremot ett p-värde på 0,0185 vilket innebar att det fanns en statistisk signifikant skillnad mellan försöksgruppen och kontrollgruppen. Emellertid producerade den hanterade gruppen signifikant mer feces i jämförelse med kontrollgruppen, se figur 14.



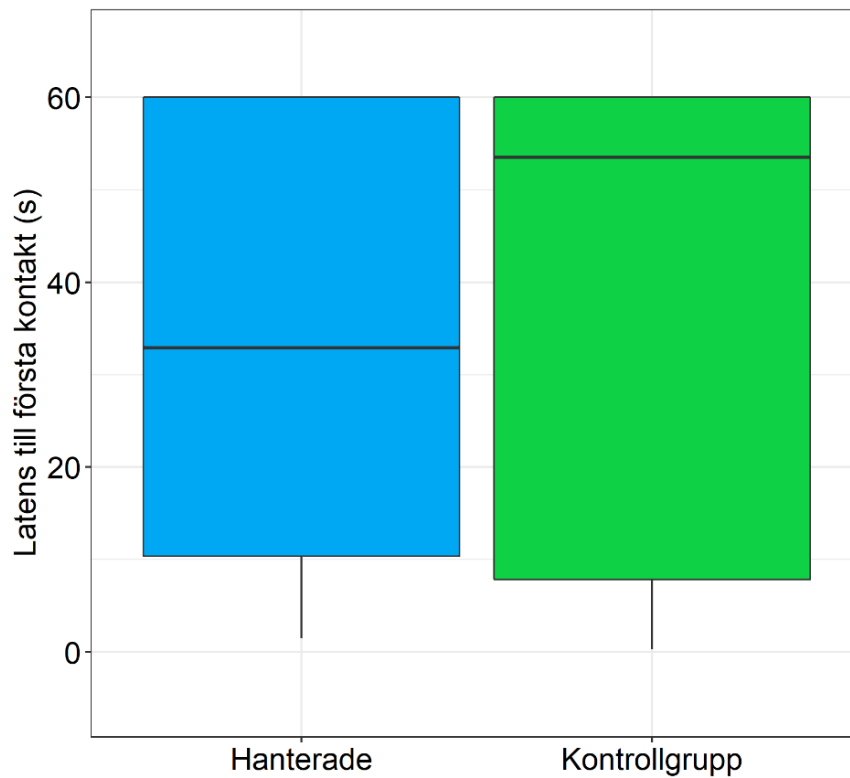
Figur 14. Mängd avföring producerad i kontrollgruppen respektive den hanterade gruppen. Låd-diagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrhårslinjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnan representerar ett värde som är mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P > 0,05$.

3.4 Approachtest II

Vare sig antal beröringar, se *figur 15*, eller latens till första kontakt, se *figur 16*, i försöksgruppen var signifikant skilda från kontrollgruppen. Båda parametrarna hade p-värden som översteg 0,05. Hanterade djur var inte mer benägna att ta kontakt med försöksledarens hand, de var ej heller snabbare på att initiera kontakt.



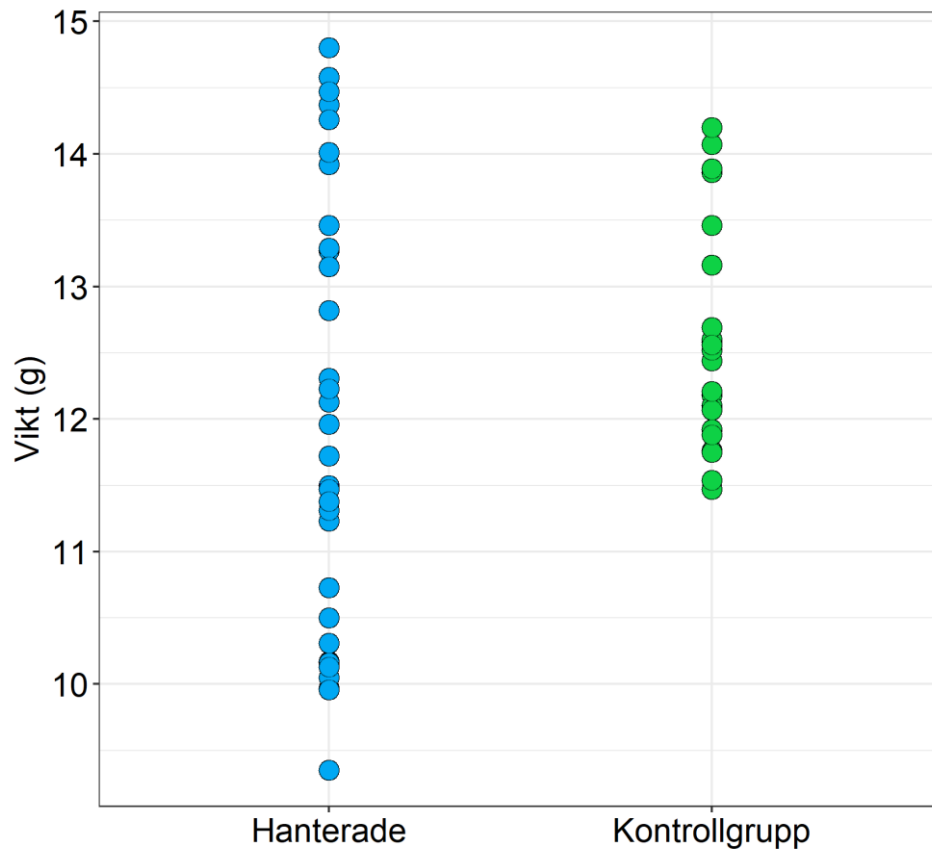
Figur 15. Antal beröringar i den hanterade gruppen respektive kontrollgruppen. Låddiagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrhårs-linjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. Stjärnorna representerar värden som ligger mer än 1,5 x lådans längd ifrån lådan och därmed ligger utanför variationen av outliers. $P > 0,05$.



Figur 16. Latens till första kontakt i den hanterade gruppen respektive kontrollgruppen. Låd-diagram där medianen är den horisontala linjen i lådan. Lådan representerar interkvartilavståndet. Morrhårslinjerna representerar de extremvärden som ligger inom ett område av 1,5 x lådans längd. $P > 0,05$.

3.5 Vikt

Det fanns ingen statistisk signifikant skillnad mellan försöksgruppens vikt och kontrollgruppens vikt, se *figur 17*. Hanteringen hade därmed ej haft någon påverkan på vikten.



Figur 17. Vikten i kontrollgruppen respektive den hanterade gruppen. Scatterplot där varje prick motsvarar en uppmätt vikt. Prickarna visar ej hur många i varje grupp som har samma uppmätta vikt, därav kan varje prick representera mer än en individ. $P > 0,05$.

4. Diskussion

Den här studien har syftat till att undersöka om minimal hantering av musungar under den första levnadsveckan är tillräckligt för att minska rädsla och öka explorativt beteende i samband med och efter avvänjning och på så sätt utforska om postnatal hantering kan pågå en kortare tid än vad som tidigare visats, utan att riskera kannibalism.

Hanteringsstrategin i den föreliggande studien skiljer sig markant från den vedertagna metoden där musungarna separeras från modern i cirka 15 minuter och under ett flertal veckor. Denna annorlunda strategi, där ungarna hanterades i två minuter dagligen från postnatal dag 1 till dag 8, valdes för att spegla Pongrácz & Altbäckers studie på kaniner för att undersöka om resultatet var möjligt att replikera på möss. Pongrácz & Altbäcker valdes specifikt på grund av att deras resultat var möjligt tidsmässigt att implementera i en riktig försöksdjursavdelning för att på så sätt stärka djurvälferden genom att göra mössen mindre rädda och stressade.

I den föreliggande studien skedde inte några fall av kannibalism; alla 54 ungar överlevde till avvänjning. Burn & Mason (2008) rekommenderar i sin studie att råttor som nyligen fött ungar ska lämnas ostörda under de första dagarna. De observerade att när burar städades en gång i veckan – vilket innebar att buren byttes ut mot en identisk med nytt strömedel och råttorna flyttades sedan över till den nya buren – skedde en ökning av kannibalism. Städning orsakar olfaktorisk och fysisk störning av miljön. Båda dessa faktorer kan orsaka stress enligt Burn & Mason. I den föreliggande studien utsattes honorna för olfaktorisk störning genom att försöksledaren med sin hand introducerade nya dofter i miljön. Den fysiska miljön påverkades av hanteringen då honorna var duktiga på att bädda in sina ungar i bomaterialet och boet var då tvunget att öppnas för att få tillgång till ungarna. Då ingen kannibalism ägde rum kan det tyda på att honorna inte upplevde alltför mycket stress av hanteringen av ungarna. Det kan även vara att stress, oavsett mängd, inte har alltför stor betydelse vid kannibalism. Weber *et al.* (2013b) beskriver att mushonor visserligen utför kannibalism på sina ungar men att detta sker efter döden redan inträffat. När mushonor som förlorade hela sin kull observerades på video kunde inget aktivt dödande av ungarna ses innan de avled utan enbart att kroppen av ungen åts upp av modern efteråt. Weber *et al.* påpekar också att andra studier på kannibalism enbart mäter antalet ungar som saknas från buren utan att undersöka hur de avlidit. Tillsammans tyder detta på att kannibalism, i den betydelse att honan aktivt dödar ungarna, är ovanligt. Den prenatala maternella hanteringen behöver därmed ej haft betydelse på avsaknaden av kannibalism.

I Pongrácz & Altbäcker (1999) studie på kaniner hanterades kaninungar en gång per dag från postnatal dag 1 till och med postnatal dag 8. Hantering pågick i tre minuter per kull och innebar att kaninerna plockades ut från boet en och en för att vägas och märkas innan de placerades tillbaka i boet. Ungarna hanterades antingen 25 minuter, 6 timmar, eller 18 timmar efter digivning. När kaninerna sedan testades i approachtest observerades det att de som hade hanterats inom 25 minuter från digivning visade mycket mindre rädsla för människor efter avvänjning. Det går inte att direkt jämföra kaniner och möss men Pongrácz & Altbäcker studie ger en indikation att hantering under den första levnadsveckan skulle kunna minska rädslan för människor även hos möss.

Arbetshypotesen har varit att de möss som ingick i försöksgruppen och blev hanterade skulle demonstrera mindre rädslobeteenden, i förhållande till de möss som inte hanterats alls. Detta innebar att de möss som hanterats, om hypotesen var sann, skulle vara mer villiga att röra vid försöksledarens hand i båda approach-tester och de skulle även vara snabbare på att initiera beröringen än kontrollgruppen. I open-field-testet skulle de hanterade mössen vara mer explorativa och aktiva och demonstrera detta genom att oftare korsa gränserna mellan de fyra kvadranterna än kontrollgruppen. De hanterade mössen borde även konsekvent spendera mer tid i centrum, besöka centrum mer och defekera mindre, då defekation kan vara ett tecken på rädsla (Lester 1968).

De möss som hanterades under sin första levnadsvecka visade, i enlighet med arbetshypotesen, mindre rädsla i approachtest I. De var snabbare på att ta kontakt med handen och besökte även handen oftare än kontrollgruppen. För approachtest I var hypotesen således sann. I approachtest II demonstrerade de hanterade djuren dock beteenden liknande kontrollgruppens. De var inte snabbare på att initiera kontakt med handen och de besökte ej heller handen oftare än kontrollgruppen. I open-field-testet var antal korsningar, antal besök i centrum och duration i centrum inte signifikant skilt mellan försöksgruppen och kontrollgruppen. Försöksgruppen, i alla tre nämnda parametrar, hade dock flera höga extremvärden till skillnad från kontrollgruppen, emellertid var värdena antingen inte nog många eller nog höga för att påverka resultatet. Hypotesen var inte sann för varken open-field-testet eller approachtest II. Mängd avföring divergerade från alla de andra resultaten då det var en signifikant skillnad mellan grupperna men det var den hanterade gruppen som defekerade mer i stället för kontrollgruppen.

4.1 Approachtest I

Det faktum att resultatet från approachtest I styrker denna studies hypotes skulle åtminstone delvis kunna bero på att detta skedde i hemburen, med modern, i grupp

och att mössen ännu inte avvants. Det är möjligt att deras stressnivå påverkats av detta till viss del, vilket i sin tur påverkat beteendet vid avvänjningen i approachtest I. Ader & Grota (1969) studie, där råttor hanteras postnatalt genom att antingen utsätts för elchocker i tre minuter två gånger dagligen i 20 dagar innan avvänjning eller genom att hållas i handen, klargör att postnatal hantering, oavsett typ, har en inverkan på kortikosteronnivåer eftersom de hanterade djuren hade längre nivåer än kontrollgruppen, som inte hanterades alls. Ader & Grota testade dock aldrig råttorna i något beteendetest vilket gör det omöjligt att bedöma om den alternativa hanteringen även gav beteendeförändringar.

4.2 Open-field-test & approachtest II

En möjlig teoretisk förklaring till att resultaten från approachtest II och open-field-testet avviker från hypotesen kan återfinnas i D'Amato *et al.* (1998) studie som styrkte att effekten av postnatal hantering är maternellt medierad. I studien utsattes mössen för hantering postnatal dag ett till postnatal dag 13 genom att musungarna flyttades till en ny bur i 15 minuter per dag och honan var kvar i hemburen. Innan honan återförenades med sina ungar fick hon en injektion med antingen kloridiazepoxid, ett anxiolytikum, eller natriumklorid. Vid 60 dagars ålder testades två av hanarna från varje kull i ett plus-maze-test – en variant på open-field-testet (Vöikar & Stanford 2023) – och där visade hanarna vars mödrar hade blivit behandlade med klordiazepoxid en signifikant minskning av explorativt beteende och en ökning av emotionalitet. De hanar vars mödrar hade givits natriumklorid uppvisade en minskning av emotionalitet och ökning av explorativitet – det förväntade beteendet av postnatalt hanterade möss. Att musungarnas beteende i approachtest II och open-field-testet inte gav förväntat resultat skulle således kunna bero på att den modersmedierade effekten på ungarna uteblev eftersom honan i denna studie ej var så stressad att hennes beteende blev så pass förändrat att det påverkade ungarnas beteende.

Mellan studien som har genomförts här och D'Amato *et al.* (1998) finns det dock en stor skillnad i hanteringen där D'Amato *et al.* utförde mycket längre hantering och en separation mellan modern och ungarna, medan mössen i denna studie ströks med två fingrar då modern var kvar i buren. Bevisligen är 15 minuters separation mellan mushonan och musungarna tillräckligt för att inducera en förändring i det maternella beteendet och därmed framkalla en förändring hos musungarna. En ytterligare studie som bekräftar vikten av separation mellan modern och ungarna är Clausen *et al.* (1997) studie på möss som utfördes mellan postnatal dag åtta och postnatal dag 21, då mössen avvandes. Det var enbart två hanliga möss från varje kull som hanterades, de plockades ut från buren en gång per dag och hölls i handen i fem minuter under tiden som resten av kullen förblev kvar med honan i hemburen.

De testades i open-field i tre minuter postnatal dag 51, 52 och 53. De hanterade mössen var mindre aktiva än de möss som ej hade hanterats och de besökte den centrala delen i open-field mer sällan. Resultatet från studien styrker idén att enbart hantera musungarna, utan att utsätta honan för en separation, inte är tillräckligt för att orsaka en förändring av honans maternella beteende då Clausing *et al.* aldrig separerade honan från alla sina ungar.

Åldern på djuren kan även haft en påverkan på avsaknaden av det förväntade resultatet. I studierna av både D'Amato *et al.* (1998) och Clausing *et al.* (1997) testades musungarna i open-field-test och plus-maze-test när de var minst 51 dagar gamla. I den föreliggande studien testades ungarna i open-field-test och approach-test II postnatal dag 22 och 23, då de precis hade blivit avvanda från sin moder och var utsatta för akut stress. Stress innan åtminstone open-field kan påverka möss och därmed resultatet av testet (Gould *et al.* 2009). Detta kan förklara varför den postnatala hanteringen hade bevisad effekt i approachtest I men inte i de påföljande testerna. I det fall mössen hade genomgått testerna när de var äldre finns det en möjlighet att resultatet hade speglat den förväntade effekten.

4.3 Övriga tester

Lester (1968) studie på råttor kan vara en förklaring till varför mängden avföring i den föreliggande studien var högre för de möss som ingick i försöksgruppen i jämförelse med kontrollgruppen. I Lesters studie testades 60 obehandlade råttor i open-field och deras aktivitetsnivå jämfördes med antalet producerade feces-pellets vilket visade att defekering inte har ett linjärt samband med aktivitetsnivån utan det är snarare u-format. De djur som defekerade mest tenderade att ha en extrem aktivitetsnivå där de rörde sig väldigt mycket eller väldigt lite. De råttor som defekerade minst rörde sig måttligt. I den föreliggande studien har försöksgruppen fler extremvärden i antalet korsningar då morrhårslinjerna är längre än hos kontrollgruppen och försöksgruppen har även två outliers (extrema värden). Lesters studie stödjer även resultaten i de övriga testerna då ingenting talar för att försöksgruppen var mer stressade än kontrollgruppen vilket en ökad mängd avföring skulle antyda. En annan förklaring till varför denna skillnad mellan grupperna sågs kan bero på mössens kön. I Wakshlak & Marta (1990) studie på 32 råttor utsattes hälften av djuren för prenatal stress och den resterande hälften var kontrollgrupp. Halva gruppen av både de som var prenatalt stressade och de som ingick i kontrollgruppen blev sedan postnatalt hanterade genom att modern och ungarna separerades 3 minuter dagligen från postnatal dag 1 till dag 21. När råttorna sedan nådde en ålder av 35 till 45 dagar testades de i open-field. Av de 32 råttorna som ingick i studien var 16 hanar och 16 honor. Av dessa 16 honor defekerade ingen i open-field-testet, däremot defekerade hanarna. I den föreliggande studien var mössens kön okänt och

därmed går det inte att säga om de djur som defekerade i open-field var hanar eller honor vilket hade kunnat förklara skillnaderna som sågs.

Vid jämförelse mellan försöksgruppen och kontrollgruppen visade det att minimal postnatal hantering av möss inte resulterande i någon skillnad på vikten vid avvänjning. I Levine (1957) studie visade författaren att postnatal hantering ger en statistisk signifikant ökning av avvänjningsvikten. Levine använde sig av hanliga råttor där 27 stycken ingick i försöksgruppen och 29 stycken ingick i kontrollgruppen. De hanterades från postnatal dag ett till och med dag 20 genom en tre minuters separation från modern dagligen. I den föreliggande studien användes BALB/c möss av blandat kön. Det var 32 stycken som ingick i försöksgruppen och 22 i kontrollgruppen. Avsaknaden av viktuppgång kan grunda sig i att Levine spenderade totalt 60 minuter per kull på djuren; den föreliggande studiens totala hanteringstid var 14 minuter per kull då varje kull hanterades i två minuter dagligen i sju dagar. Hanteringen skilde sig även drastiskt åt då mössen inte flyttades från boet till skillnad från Levines råttor. Pryce *et al.* (2001) visade dock att trots att samma metod av postnatal hantering användes i studien som också utfördes på råttor sågs ingen signifikant ökning av avvänjningsvikten. Från detta går det att dra slutsatsen att avsaknaden av viktuppgång mest troligt beror på att det inte finns nog med stöd för teorin att postnatal hantering faktiskt leder till en ökad avvänjningsvikt.

4.4 Studiedesign

Det finns några osäkerheter i den här studien. Antalet möss som ingick i försöksgruppen och kontrollgruppen skiljde sig åt med tio stycken. Orsaken till det var att mushonorna födde väldigt ojämna kullar där den största var elva stycken och den minsta var en. Ett jämt antal ungar per kull hade troligtvis gjort studien mer tillförlitlig. I andra studier använder man kullutjämning, men det var inte möjligt i den föreliggande studien då honorna födde på olika dagar. Det ojämna antalet ledde till att vissa kullar, såsom den med elva stycken, spenderade markant mer tid i försöksrummet där open-field testades än en del andra. Den varierande storleken på kullarna utgjorde även en svårighet för blindningen i approachtest I då den utfördes i gruppen. Kullen med enbart en unge var alltför lätt att känna igen och även om försöksledaren inte tyckte sig minnas någon annan kull är det möjligt att det undermedvetna spelade in i bedömningarna av filmerna. Det skedde även en olycka i labbet under tiden studien pågick. Ett angränsade rum blev översvämmat på grund av fel i sprinklersystemet. På grund av detta startade larm och det blev mycket ljud och rörelser. Huruvida detta påverkade mössen eller inte är svårt att säga. Försöksledaren upplevde att de två kullar som blev utsatta visade ett mer stressat beteende genom att vara svårfångade och hoppa ur buren vid vägning.

4.5 Vidare forskning

En intressant aspekt av studien är det faktum att approachtest I överensstämde med hypotesen när inget annat test gjorde det. Approachtest I var dock unikt. Det utfördes i grupp, i hemburen, modern var närvarande och det skedde före stressen av avvänjningen. Allt detta kan ha påverkat mössens beteende. Enligt Morrison & Hill (1967) är möss i grupp mer explorativa och aktiva. Ytterligare forskning skulle behövas för att kunna dra några slutsatser.

4.6 Konklusion

Den slutsats som går att dra av denna studie är således att minimal neonatal hantering av musungar under den första levnadsveckan är tillräckligt för att minska rädsla vid avvänjning i grupp men inte nog för att öka det explorativa beteendet eller reducera rädsla dagarna efter. I det fall att musungarna hade testats vid en senare tidpunkt är det möjligt att resultatet hade påvisat den förväntade effekten av postnatal hantering.

Referenser

- Abramova, O., Ushakova, V., Zorkina, Y., Zubkov, E., Storozheva, Z., Morozova, A. & Chekhonin, V. (2021). The behavior and postnatal development in infant and juvenile rats after ultrasound-induced chronic prenatal stress. *Frontiers in Physiology*, 12, 659366. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.659366>
- Ader, R. & Grotta, L.J. (1969). Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiology & Behavior*, 4 (3), 303–305. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(69\)90179-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(69)90179-6)
- Anderson, L.M., Samineni, S., Wilder, D.M., Lara, M., Eken, O., Urioste, R., Long, J.B. & Arun, P. (2021). The neurobehavioral effects of buprenorphine and meloxicam on a blast-induced traumatic brain injury model in the rat. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.746370> [2023-12-03]
- Arck, P.C. (2019). When 3 Rs meet a fourth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *Journal of Reproductive Immunology*, 132, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2019.03.004>
- Augustsson, H., Lindberg, L., Höglund, A.U. & Dahlborn, K. (2002). Human-animal interactions and animal welfare in conventionally and pen-housed rats. *Laboratory Animals*, 36 (3), 271–281. <https://doi.org/10.1258/002367702320162388>
- Barlow, S.M., Knight, A.F. & Sullivan, F.M. (1978). Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology*, 18 (2), 211–218. <https://doi.org/10.1002/tera.1420180206>
- Blokland, A., ten Oever, S., van Gorp, D., van Draanen, M., Schmidt, T., Nguyen, E., Krugliak, A., Napoletano, A., Keuter, S. & Klinkenberg, I. (2012). The use of a test battery assessing affective behavior in rats: Order effects. *Behavioural Brain Research*, 228 (1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.042>
- Bodden, C., von Kortzfleisch, V.T., Karwinkel, F., Kaiser, S., Sachser, N. & Richter, S.H. (2019). Heterogenising study samples across testing time improves reproducibility of behavioural data. *Scientific Reports*, 9, 8247. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44705-2>
- Bonhomme, F. & Orth, A. (2017). *Mus musculus. I: Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06751-0>
- Burn, C.C. & Mason, G.J. (2008). Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 114 (1), 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.02.005>
- Cabrera, R.J., Rodríguez-Echandía, E.L., Jatuff, A.S.G. & Fóscolo, M. (1999). Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1229–1237. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999001000009>
- Clausing, P., Mothes, H.K., Opitz, B. & Kormann, S. (1997). Differential effects of communal rearing and preweaning handling on open-field behavior and hot-plate

- latencies in mice. *Behavioural Brain Research*, 82 (2), 179–184.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)80987-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)80987-4)
- Cloutier, S., Panksepp, J. & Newberry, R.C. (2012). Playful handling by caretakers reduces fear of humans in the laboratory rat. *Applied Animal Behaviour Science*, 140 (3), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.06.001>
- Csatádi, K., Kustos, K., Eiben, Cs., Bilkó, Á. & Altbäcker, V. (2005). Even minimal human contact linked to nursing reduces fear responses toward humans in rabbits. *Applied Animal Behaviour Science*, 95 (1), 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.05.002>
- D’Amato, F.R., Cabib, S., Ventura, R. & Orsini, C. (1998). Long-term effects of postnatal manipulation on emotionality are prevented by maternal anxiolytic treatment in mice. *Developmental Psychobiology*, 32 (3), 225–234.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199804\)32:3<225::aid-dev6>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199804)32:3<225::aid-dev6>3.0.co;2-q)
- Denenberg, V.H. (1999). Commentary: Is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? *Developmental Psychobiology*, 34 (1), 1–3.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199901\)34:1<1::AID-DEV2>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199901)34:1<1::AID-DEV2>3.0.CO;2-U)
- Drai, D., Kafkafi, N., Benjamini, Y., Elmer, G. & Golani, I. (2001). Rats and mice share common ethologically relevant parameters of exploratory behavior. *Behavioural Brain Research*, 125 (1–2), 133–140. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00290-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00290-x)
- Eilam, D. (2004). Locomotor activity in common spiny mice (*Acomys cahirinuse*): The effect of light and environmental complexity. *BMC Ecology*, 4 (1), 16.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-16>
- Elwood, R.W. (1991). Ethical implications of studies on infanticide and maternal aggression in rodents. *Animal Behaviour*, 42 (5), 841–849.
[https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80128-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80128-9)
- Fonio, E., Golani, I. & Benjamini, Y. (2012). Measuring behavior of animal models: faults and remedies. *Nature Methods*, 9 (12), 1167–1170.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2252>
- Gould, T.D., Dao, D.T. & Kovacsics, C.E. (2009). The open field test. I: Gould, T.D. (red.) *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests*. Humana Press. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Grimm, V.E. & Frieder, B. (1987). The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. *International Journal of Neuroscience*, 35 (1–2), 65–72.
<https://doi.org/10.3109/00207458708987111>
- Gärtner, K., Büttner, D., Döhler, K., Friedel, R., Lindena, J. & Trautschold, I. (1980). Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals*, 14 (3), 267–274. <https://doi.org/10.1258/002367780780937454>
- Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18 (3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>

- Hao, Y., Huang, W., Nielsen, D.A. & Kosten, T.A. (2011). Litter gender composition and sex affect maternal behavior and DNA methylation levels of the *oprm1* gene in rat offspring. *Frontiers in Psychiatry*, 2, 21. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00021>
- Heiderstadt, K.M., Vandenbergh, D.J., Gyekis, J.P. & Blizard, D.A. (2014). Communal nesting increases pup growth but has limited effects on adult behavior and neurophysiology in inbred mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53 (2), 152–160
- Hickman, D.L., Johnson, J., Vemulapalli, T.H., Crisler, J.R. & Shepherd, R. (2017). Commonly used animal models. *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>
- Hu, Y., Liu, Y. & Li, S. (2022). Effect of acute cold stress on neuroethology in mice and establishment of its model. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 12 (19), 2671. <https://doi.org/10.3390/ani12192671>
- Hurst, J.L. & West, R.S. (2010). Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*, 7 (10), 825–826. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500>
- Jiménez, J.A. & Zylka, M.J. (2021). Controlling litter effects to enhance rigor and reproducibility with rodent models of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 13 (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s11689-020-09353-y>
- Knight, P., Chellian, R., Wilson, R., Behnood-Rod, A., Panunzio, S. & Bruijnzeel, A.W. (2021). Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 204, 173168. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P.C. & Sarnyai, Z. (2019). The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. I: Guest, P.C. (red.) *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*. Springer. 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Kvetnansky, R., Sun, C.L., Lake, C.R., Thoa, N., Torda, T. & Kopin, I.J. (1978). Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology*, 103 (5), 1868–1874. <https://doi.org/10.1210/endo-103-5-1868>
- Lehmann, J., Stöhr, T. & Feldon, J. (2000). Long-term effects of prenatal stress experience and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behavioural Brain Research*, 107 (1), 133–144. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00122-9)
- Leppänen, P.K. & Ewalds-Kvist, S.B.M. (2005). Crossfostering in mice selectively bred for high and low levels of open-field thigmotaxis. *Scandinavian Journal of Psychology*, 46 (1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.2005.00431.x>
- Lester, D. (1968). Two tests of a fear-motivated theory of exploration. *Psychonomic Science*, 10 (11), 385–386. <https://doi.org/10.3758/BF03331573>

- Levine, S. (1957). Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science (New York, N.Y.)*, 126 (3270), 405. <https://doi.org/10.1126/science.126.3270.405>
- Levine, S., Haltmeyer, G.C., Karas, G.G. & Denenberg, V.H. (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology & Behavior*, 2 (1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(67\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(67)90011-X)
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science (New York, N.Y.)*, 277 (5332), 1659–1662. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>
- Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24 (1), 1161–1192. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1161>
- Meaney, M.J. & Aitken, D.H. (1985). The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain Research*, 354 (2), 301–304. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90183-x](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90183-x)
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bhatnagar, S. & Sapolsky, R.M. (1991). Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiology of Aging*, 12 (1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90036-j](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90036-j)
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Sharma, S. & Viau, V. (2008). Basal ACTH, Corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology*, 55 (2), 204–213. <https://doi.org/10.1159/000126116>
- Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Weaver, S., Yau, J., Chapman, K. & Seckl, J.R. (2000). Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: The effects of thyroid hormones and serotonin. *Journal of Neuroscience*, 20 (10), 3926–3935. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03926.2000>
- Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R. & Plotsky, P.M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience*, 18 (1–2), 49–72. <https://doi.org/10.1159/000111395>
- Meek, L.R., Burda, K.M. & Paster, E. (2000). Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiology & Behavior*, 71 (5), 543–549. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00368-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00368-1)
- Morrison, B.J. & Hill, W.F. (1967). Socially facilitated reduction of the fear response in rats raised in groups or in isolation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63 (1), 71–76. <https://doi.org/10.1037/h0024175>

- Nagy, Z.M. & Glaser, H.D. (1970). Open-field behavior of C57BL/6J mice: Effect of illumination, age, and number of test days. *Psychonomic Science*, 19 (3), 143–145. <https://doi.org/10.3758/BF03335518>
- Núñez, J.F., Ferré, P., Escorihuela, R.M., Tobeña, A. & Fernández-Teruel, A. (1996). Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiology & Behavior*, 60 (5), 1355–1359. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00225-9)
- de Passillé, A.M. & Rushen, J. (2005). Can we measure human–animal interactions in on-farm animal welfare assessment?: Some unresolved issues. *Applied Animal Behaviour Science*, 92 (3), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.05.006>
- Peters, A.G., Bywater, P.M. & Festing, M.F.W. (2002). The effect of daily disturbance on the breeding performance of mice. *Laboratory Animals*, 36 (2), 188–192. <https://doi.org/10.1258/0023677021912334>
- Plescica, F., Marino, R.A.M., Navarra, M., Gambino, G., Brancato, A., Sardo, P. & Cannizzaro, C. (2014). Early handling effect on female rat spatial and non-spatial learning and memory. *Behavioural Processes*, 103, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.10.011>
- Plotsky, P.M., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Caldji, C., Sharma, S. & Meaney, M.J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*, 30 (12), 2192–2204. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300769>
- Podberscek, A.L., Blackshaw, J.K. & Beattie, A.W. (1991). The effects of repeated handling by familiar and unfamiliar people on rabbits in individual cages and group pens. *Applied Animal Behaviour Science*, 28 (4), 365–373. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90168-W](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90168-W)
- Pongrácz, P. & Altbäcker, V. (1999). The effect of early handling is dependent upon the state of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pups around nursing. *Developmental Psychobiology*, 35 (3), 241–251. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199911\)35:3<241::aid-dev8>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199911)35:3<241::aid-dev8>3.0.co;2-r)
- Pryce, C.R., Bettschen, D. & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38 (4), 239–251. <https://doi.org/10.1002/dev.1018>
- Reading, A.J. (1966). Effects of parity and litter size on the birth weight of inbred mice. *Journal of Mammalogy*, 47 (1), 111–114. <https://doi.org/10.2307/1378075>
- Seibenhener, M.L. & Wooten, M.C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (96), 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Shoji, H. & Miyakawa, T. (2019). Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacology Reports*, 39 (2), 100–118. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>

- Shyu, W.C., Mordenti, J.J., Nightingale, C.H., Tsuji, A. & Quintiliani, R. (1987). Effect of stress on the pharmacokinetics of amikacin and ticarcillin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (3), 265–266. <https://doi.org/10.1002/jps.2600760318>
- Võikar, V. & Stanford, S.C. (2023). The open field test. I: Harro, J. (red.) *Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders: Tests and Models in Mice and Rats*. Springer US. 9–29. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_2
- Wakshlak, A. & Marta, W. (1990). Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology & Behavior*, 48 (2), 289–292. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90315-U](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90315-U)
- Weber, E., Algers, B., Würbel, H., Hultgren, J. & Olsson, I. (2013a). Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice. *Reproduction in Domestic Animals*, 48 (2), 292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02147.x>
- Weber, E.M., Algers, B., Hultgren, J. & Olsson, I.A.S. (2013b). Pup mortality in laboratory mice – infanticide or not? *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55 (1), 83. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-83>
- Whitfield, L., Gibbs, P. & Morris, T. (2019). 41 - Veterinary control of reproduction in rodent colonies. I: Noakes, D.E., Parkinson, T.J., & England, G.C.W. (red.) *Veterinary Reproduction and Obstetrics (Tenth Edition)*. W.B. Saunders. 711–723. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00041-0>
- Zaharia, M.D., Kulczycki, J., Shanks, N., Meaney, M.J. & Anisman, H. (1996). The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors. *Psychopharmacology*, 128 (3), 227–239. <https://doi.org/10.1007/s002130050130>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Postnatal hantering, vilket även kan kallas tidig hantering, är en term för ett behandlingssätt på försöksdjur såsom möss, råttor och kaniner innan de är gamla nog att skiljas från sin moder. Behandlingen innebär att unga djur plockas ut tillsammans med sina syskon från deras bur och placeras i en annan bur separerade från sin moder. Vanligtvis spenderar de ungefär 15 minuter åtskilda och sedan flyttas ungarna tillbaka till deras hemmabur. Denna hantering av ungarna kan pågå i allt från en vecka till tre. Dock påbörjas vanligtvis inte hanteringen förrän sju dagar efter födelsen för att undvika kannibalism av ungarna då detta kan ske om modern blir störd. Orsaken till att denna behandling utförs är att stressen som modern utsätts för när hennes ungar flyttas från henne tros förändra hennes beteende mot ungarna då hon ägnar extra mycket tid till dem efter att de återförenas. Denna beteendeförändring ger upphov till andra förändringar i ungarna. De blir mindre rädda, de blir mer nyfikna och de blir mer stresståliga. I en försöksdjursavdelning är detta väldigt positivt då det ökar djurens välfärd och ger potentiellt mer pålitliga forskningsresultat än från stressade och rädda djur.

I den här studien ville vi undersöka om vi kunde erhålla dessa positiva egenskaper även om den postnatala hanteringen var minimal och utfördes på musungar i väldigt ung ålder, samt utan att honan stressades till kannibalism. Innan mössen föddes vandes alla honor vid hantering genom att en hand stoppades ner i deras bur i två minuter per dag under 13 dagar. Dagen efter mössen föddes påbörjades hanteringen och den pågick under en veckas tid. Den hantering vi använde oss av var att musungarna fick stanna kvar i boet tillsammans med sin moder och vi strök dem mjukt över kroppen med två fingrar i två minuter per dag. Efter en vecka lämnades mössen ifred fram tills dagen de skulle skiljas från sin modern vilket var dag 21. De möss som ingick i kontrollgruppen hanterades aldrig. I studien ingick 10 kullar med 5 kullar i försöksgruppen och 5 kullar i kontrollgruppen med totalt 54 möss.

Vid dag 21 när de avvandes från sin moder blev de först testade tillsammans i ett approachtest. Ett approachtest innebär att försöksledaren i studien placerar sin passiva hand i musungarnas bur under en minut. Sedan mättes hur länge det tog innan en av musungarna vidrörde handen. Antalet gånger musungarna rörde vid handen mättes också. Detta är ett test på rädsla. De möss som är mindre rädda rör snabbare vid handen och rör oftare vid handen.

Dagen efter testades musungar i ett open-field-test. Detta innebär att mössen, en och en, placerades i en tom, öppen låda i tio minuter. De filmades under tiden de var i lådan för att se var de rörde sig. Detta är ett test på nyfikenhet och rädsla. En

stor, tom låda är väldigt skrämmande för en liten mus. Möss som är mindre rädda och mer nyfikna kommer vara mer aktiva i lådan, spendera mer av sin tid i den centrala delen av lådan och producera mindre avföring.

Dagen därpå testades musungarna i ännu ett approachtest, den här gången ensamma. Det var en likadan procedur som det första och samma parametrar mättes även den här gången. Mössen vägdes också efter att approachtestet var över för att jämföra vikten mellan grupperna.

Resultatet visade att de ungar som ingick i försöksgruppen och därmed hade blivit hanterade var mindre rädda i det första approachtestet och därmed hade hanteringen givit resultat. De resterande testerna visade dock inte samma resultat utan där skiljde sig inte försöksgruppen från kontrollgruppen.

Det finns olika möjliga förklaringar till varför resultatet skiljde sig åt mellan testerna. En anledning kan vara att den postnatala hanteringen i denna studie skiljde sig åt från de flesta andra studier om postnatal hantering. En annan möjlighet är att i det första approachtestet testas mössen i grupp; i de två andra testerna var de ensamma. Den slutsats som går att dra av studien är att minimal postnatal hantering av musungarna under den första levnadsveckan är tillräckligt för att minska rädsla vid avvänjning men inte nog för att öka det explorativa beteendet eller reducera rädsla dagarna därpå. Mer studier på den här metoden behövs för att kunna fastställa huruvida reduceringen av rädsla som påvisades i det första approachtestet kan uppnås även efter avvänjning.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Patrica Hedenqvist för alla värdefulla råd och en fantastisk stöttning. Jag vill även tacka Frida Ingmarsson, Peter Wickman, Sten-Olof Fredriksson och Olov Carlsson för all deras hjälp och trevliga sällskap som förgyllde mitt arbete. Till sist vill jag tacka mina vänner och min familj för allt stöd de har givit. Ett särskilt tack riktas till min syster Elin för hennes outhärliga hjälp.

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 ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

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