



Miljø- og
Fødevareministeriet
Fødevarestyrelsen

Danmarks 3R-Center

RRR

FOR SØGS DYR

– og alternativer

Forord

De fleste har nok hørt om forsøgsdyr, og mange har også en holdning til dyreforsøg. Men det er nok de færreste, der kender de regler, som gælder for dyreforsøg og har hørt om de 3R'er (*Replacement*, *Reduction* og *Refinement*), som er begreber, der tilgodeser forsøgsdyr.

Gennem de sidste 20-30 år er de 3R'er blevet et globalt anerkendt begreb i forskningsverdenen og industrien. *Replacement*, *Reduction* og *Refinement* skal nemlig sikre, at man bruger færrest mulige forsøgsdyr, samt at de dyr der benyttes, får de bedst mulige forhold.

Ophavsret

Materialet er udarbejdet af Aiko Sho Nielsen. Ophavsretten ligger hos Danmarks 3R-Center.

Indhold

Færre og mere skånsomme dyreforsøg

Historien bag de tre 3R'er	5
De tre R'er kort fortalt	5
Forsøgsdyr – et historisk tilbageblik	6
Et dyreetisk dilemma	7
Dyret som model for mennesket	7
Rettighedsetik kontra Nytteetik	10
Love, regler og 3R	12
Fokus på forskning og formidling	14
Tid til et fjerde R?	15

Appendix

Immunisering af høns med antigen i sprayform

Undersøgelse af en smertefri metode til produktion af antistoffer i æg	18
Antistoffer til mange formål	18
Hønseæg er fulde af antistoffer	18
Ukendte faktorer udfordrer	20

Kunstig lungemodel kan sikkerhedsteste spraymidler

Når du trækker vejret	23
Partiklernes størrelse er vigtig	25
Surfaktantlaget	27
Dråbe som in vitro-model	30



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

Quiz

Hvor mange forsøgsdyr blev ca. anvendt i Danmark i 2017?

- A** 500 **B** 50.000 **C** 250.000 **D** 1.000.000

Hvilken dyreart anvender man flest af i Danmark?

- A** Fisk **B** Grise **C** Mus **D** Rotter

Hvad bruges der flest forsøgsdyr til i Danmark?

- A** Uddannelse og undervisning
(læge- og dyrlægestuderende)
- B** Udvikling af lægemidler
(medicinalindustrien)
- C** Test af kosmetik
- D** Grundforskning (universiteterne)
- E** Sikkerhedstest af kemikalier

Færre og mere skånsomme dyreforsøg

Hvis vi skal se på, hvordan ideen om 3R opstod, skal vi en tur tilbage til 1959. Her havde zoolog og psykolog William Russell og mikrobiolog Rex Burch i nogle år arbejdet på en opgave for *The Universities Federation for Animal Welfare* (UFAW). Opgaven gik ud på, at de to forskere skulle undersøge, hvordan man kunne gøre livet bedre for forsøgsdyr.

Historien bag de tre 3R'er

I begyndelsen af 1900-tallet var der for alvor kommet fart på forskningen indenfor naturvidenskabelige discipliner (medicin, fysiologi, biokemi mv.). Udviklingen betød, at der blev anvendt mange flere forsøgsdyr end tidligere. Russell og Burch havde stor erfaring med laboratorieteknikker og forsøgsdyr. De samlede resultaterne af deres arbejde i bogen: *'The Principles of Humane Experimental Technique'*. Heri beskrev de, hvordan man kunne arbejde med principperne Replacement, Reduction og Refinement (3R) og dermed mindske brugen af forsøgsdyr og gøre dyreforsøg så skånsomme som muligt. Bogen er den dag i dag et hovedværk indenfor arbejdet med forsøgsdyr.

De tre R'er kort fortalt

- **Replacement** (erstatning): Metoder hvor forsøgsdyr erstattes af ikke-følede materiale. Man kalder dem også dyrefri alternativer. Det kan f.eks. være brug af cellekulturer (også kaldet *in vitro*-metoder), matematiske modeller eller computermødelles (også kaldet *in silico*-metoder), organer eller væv taget fra dyr eller mennesker (også kaldet *ex vivo*-metoder) og mikroorganismer eller primitive parasitter.
- **Reduction** (reduktion): Forbedring af et forsøg, der resulterer i, at færre forsøgsdyr er nødvendige for at opnå den samme mængde viden, eller større mængde viden med samme antal forsøgsdyr. Man kan for eksempel begrænse antallet af dyr til forsøget, ved at fjerne noget af den variation, der findes dyrene imellem, og som gør resultaterne svære at tolke. For at opnå dette kan man vælge dyrene efter bestemte ligheder i deres fysiologi, som er vigtige for forsøget. En reduktionsforbedring må ikke føre til dårligere dyrevelfærd.
- **Refinement** (forfinelse): Forbedringer, der resulterer i, at de enkelte dyr udsættes for mindre lidelse og stress i forbindelse med forsøget. Man kan f.eks. forbedre operationsteknikker, måden hvorpå man smertebehandler eller vælge den mest skånsomme blodprøveteknik. Man kan desuden stoppe forsøget tidligere end normalt, for at dyret ikke skal belastes mere end højest nødvendigt (forbedring af 'humane endepunkter'). Forfinelse kan også bestå i, at man forbedrer de forhold, som dyrene lever under, sådan at de bedre opfylder dyrets biologiske behov. Sociale dyr kan eksempelvis gives bedre mulighed for kontakt med artsfæller, og buret kan indrettes på en måde, så dyrene bedre kan lege, pleje sig selv og søge skjul. Når dyrepassere bruger tid på at gøre dyrene trygge, og f.eks. træner dyrene, så de føler sig mindre stressede under forsøgene, kan det også ses som en forfinelsesforbedring.

Forsøgsdyr – et historisk tilbageblik

Men hvorfor bruge tid, kræfter og penge på forsøgsdyrs velfærd? Spørgsmålet kan virke provokerende, men går vi blot et par hundrede år tilbage, fandtes der ingen love, som beskyttede dyr. I videnskabelige kredse havde den franske filosof og naturvidenskabsforsker René Descartes' (1596-1650) teorier haft stor betydning for synet på dyr. På en tid hvor narkosen ikke var opfundet endnu, udførte han dyreforsøg, hvor han skar levende dyr op – altså uden at bedøve dem først. Descartes mente nemlig ikke, at vi havde noget moralsk ansvar overfor dyr, fordi de, ifølge ham selv, ikke havde nogen bevidsthed og derfor intet kunne føle. Ikke alle var enige med Descartes. I 1789 formulerede den engelske filosof Jeremy Bentham sit ønske om, at dyr fik rettigheder sådan her: "Spørgsmålet er ikke, kan de tænke? Heller ikke, kan de tale? Det er, kan de lide?".

I dag ved vi, at hvirveldyr (fisk, padder, krybdyr, fugle og pattedyr) har et nervesystem, som gør det muligt for dem at reagere på og føle smerte. Og resultater fra studier af bl.a. fugle og pattedyrs adfærd gør det svært at afvise, at mange dyr desuden er i stand til at føle angst, frygt, kedsomhed, glæde mv. I 1916 fik Danmark sin første Dyreværnslov. Ved flere lejligheder er denne blevet ændret og udvidet. Loven afspejler, at vi med tiden har fået større viden om og forståelse for dyr.



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

Quiz

Hvilket af disse eksempler beskriver et dyreforsøg?

- A** En forsker vil lave en undersøgelse af humlebiens vinger. Han vil derfor indfange 200 humlebier, studere dem på forskellige vis i et laboratorium, og til sidst aflive dem med æter for at dissekere dem.
- B** En forsker vil gerne indfange flagermus og tage blodprøver for at undersøge deres DNA. Flagermusene sættes fri, så snart man har taget blodprøven.
- C** En forsker vil gerne indfange pindsvin i fælder og sætte radiosendere på dem og derefter genudsætte dem, for at studere deres færden i naturen.

FIGUR 1: Lægestuderende kan øve sig i mikrokirurgi på en plasticattrap, som erstatter rotter.



Foto: Peter Bollen

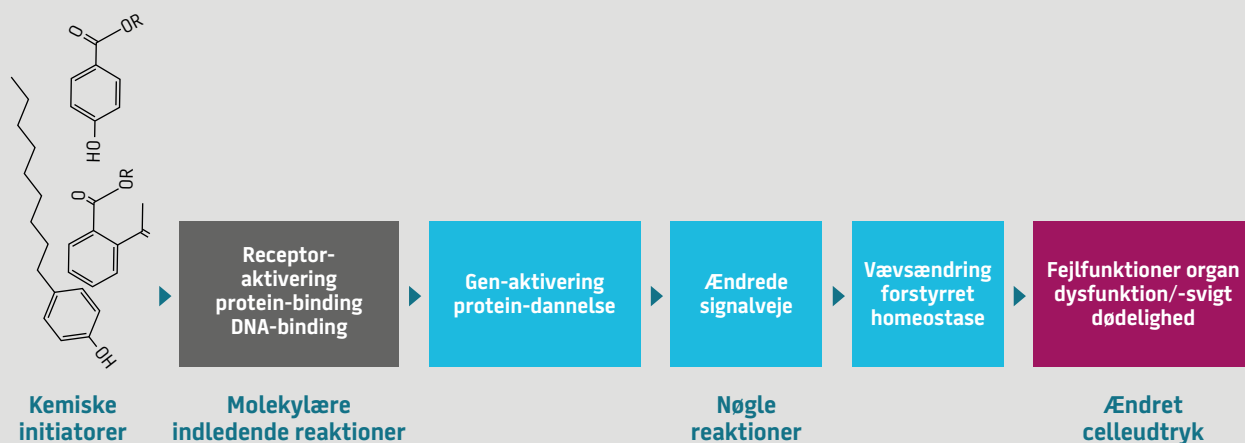
Et dyreetisk dilemma

I første paragraf af Dyreværnsloven står der, at: "Dyr skal behandles forsvarligt og beskyttes bedst muligt mod smerte, lidelse, angst, varigt men og væsentlig ulempe". Men når det gælder forsøgsdyr, står man i et etisk dilemma, idet den viden, som dyreforsøg kan give os, eksempelvis kan bruges til at udvikle livsvigtig medicin til både mennesker og dyr. Kaster man et blik på Nobelprisen i medicin og fysiologi gennem de seneste 105 år, har hele 91 af prismodtagerne anvendt forsøgsdyr i deres forskning. Der er ingen tvivl om, at dyreforsøg har spillet en kolossal rolle for bl.a. forståelsen af menneskekroppen, ligesom dyreforsøg har bidraget med livsvigtig viden om, hvordan forskellige kemiske stoffer, for eksempel i lægemidler, påvirker den menneskelige organisme.

Dyret som model for mennesket:

Selvom man arbejder på at udvikle dyrefri metoder – eksempelvis i undervisningen af læge- og dyrlægestuderende, samt i undersøgelserne af om stoffer i husholdningsprodukter, fødevarer og medicin er farlige, er der stadig ting, som er svære at undersøge uden at bruge forsøgsdyr. Når man bruger forsøgsdyr, som model for menneskets krop, kan de give os viden om både sygdomme, og hvordan indholdsstoffer i f.eks. ny medicin påvirker kroppen. Vi har endnu ingen dyrefri modeller, som fuldt ud kan efterligne hele den komplekse organisme, som dyrene (og vi selv) nu engang er. En del forskning på universiteterne kræver også forsøgsdyr, for eksempel når man vil undersøge kroppens grundlæggende funktioner.

At bruge dyr som model for mennesket har dog også sine ulemper. Godt nok er både mennesker og mange forsøgsdyr pattedyr, men helt ens er vi trods alt ikke. Det gælder bl.a. den måde, vores krop reagerer på kemiske stoffer, som vi udsættes for. Et velkendt eksempel herpå er lægemidlet Thalidomid, som i 1950'erne blev solgt til gravide kvinder, som et middel mod morgenkvalme. Forinden var medicinen blevet testet på forskellige gnavere, hvorefter det blev godkendt. Men hos kvinderne gav medicinen alvorlige fosterskader, hvilket klart viste, at mennesker var mere følsomme overfor dette lægemiddel, end de forsøgsdyr man havde anvendt. Den viden bidrog til, at man mange steder begyndte at stille større krav til tests af lægemidler på forsøgsdyr, for eksempel at der skulle laves forsøg på drægtige dyr. Omvendt kan der også være stoffer, som vi mennesker tåler bedre end visse dyrearter. Hunde, katte og papegøjer kan blive alvorligt syge af at spise chokolade.



FIGUR 2: Overordnet model for Adverse Outcome Pathways (AOPs) (Illustration: Jens Bøgeskov).

Så hvis chokolade var blevet testet på de arter, ville chokolade være blevet forbudt at spise for mennesker. Heldigvis har vi mennesker nydt chokolade, længe inden man overhovedet begyndte at tænke på at bruge forsøgsdyr. Naturligt nok er mennesket den bedste model for sig selv, og derfor kan *in vitro*- eller *ex vivo*-metoder, hvor man bruger cellekulturer og væv fra mennesker, i nogle tilfælde give et mere pålideligt resultat end dyreforsøg.

En anden ulempe ved dyreforsøg er, at de koster mange penge og er tidskrævende. Der kan desuden være mange fejlkilder ved forsøget, fordi dyrene kan have individuelle forskelle i både fysiologi og adfærd, ligesom fysiske forhold i stalden kan bidrage til et uens forsøgsforløb. Den slags forskelle kan gøre resultaterne svære at tolke.

In vitro- og *ex vivo*- metoder udføres også under kontrollerede forhold i et laboratorium, kræver ikke meget plads og giver hurtigere resultater. I dag bruger man flere af disse metoder i kombination med *in silico* computermodeller som QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), der bygger på viden om, hvordan den kemiske opbygning af et molekyle er med til at afgøre, hvordan det påvirker kroppen. QSAR's bruges blandt andet til at vurdere, om stoffer kan være skadelige for mennesker. Det sparer mange dyreforsøg.

Man er også begyndt at lave oversigter, som kan hjælpe os med at forudsige, om et kemisk stof fører til skadelige reaktioner i kroppen – eksempelvis hudallergi. Disse oversigter, som kaldes *Adverse Outcome Pathways* (AOPs), er meget komplekse, da de kombinerer viden om en række forskellige trin i kroppens signalveje. Et vigtigt redskab er såkaldte biomarkører, som kan være bestemte celler, gener og genprodukter, enzymer og hormoner, som hver især kan findes ved specifikke processer i kroppen. Hvis man ved hvilke stoffer, der udløser bestemte biomarkører i kroppen, kan man forudsige, om et bestemt stof vil være skadeligt, ved for eksempel at kunne give allergi (se fig. 2).

Quiz



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

Må man benytte aber til dyreforsøg i EU?

- A** Nej, man må ikke foretage dyreforsøg med aber (primater) af nogen art.
- B** Ja, man må godt bruge aber (primater) til dyreforsøg – der gælder de samme regler, som for mus og rotter.
- C** Man skal opfylde nogle særlige krav, hvis man vil foretage dyreforsøg på aber (menneskeaber må ikke benyttes til forsøg).

Må man teste kosmetikprodukter på forsøgsdyr i EU?

- A** Nej, der er totalforbud i EU (og dermed i Danmark) mod brug af forsøgsdyr til testning af kosmetik.
- B** Nej, man må ikke teste kosmetik på forsøgsdyr i EU, men en virksomhed kan vælge at få testet produktet udenfor EU, og bagefter sælge det i EU.
- C** Ja, så længe forsøget lever op til det enkelte EU-lands lovgivning, må man godt bruge forsøgsdyr til at teste kosmetik.
- D** Ja, men kun hvis produktet eller nogle af ingredienserne, ikke tidligere er blevet testet på dyr.

Er der tænkt på dyrevelfærd i reglerne om dyreforsøg?

- A** Ja, men kun med hensyn til den måde dyrenes holdes opstaldet på; for eksempel størrelsen af deres bure, at dyrene får foder nok osv.
- B** Ja, forsøgsdyr har deres egen lov, som skal beskytte dyrenes velfærd på forskellige måder.
- C** Nej, forsøgsdyr er en særlig gruppe, som ikke er beskyttet af Dyreværnsloven, og der er ikke regler for, at der skal tages hensyn til deres velfærd.

Rettighedsetik kontra Nytteetik:

Når man taler om forsøgsdyr, støder man ofte på synspunkter, som knytter sig til et af to forskellige etiske principper. Det ene lægger vægt på, at alle dyr har en indre værdi og dermed har rettigheder, som vi har pligt til at respektere. I yderste konsekvens betyder det, at vi ikke kan tillade os at bruge dyr til forsøg, blot fordi det kommer mennesker eller andre dyr til gode. Denne tankegang har baggrund i **Rettighedsetik**.

Det andet synspunkt er, at dyreforsøg godt kan retfærdiggøres, hvis den lidelse, som dyrene udsættes for, samlet set opvejes af den gavn, som resultaterne gør for andre. Denne tankegang finder man i **Nytteetikken**. Den går kort fortalt ud på, at man i samfundet skal forsøge at opnå så meget velfærd som muligt, for så mange som muligt. I ekstreme tilfælde betyder et nytteetisk synspunkt, at det kan accepteres, at nogle få individer udsættes for betydelige lidelser, hvis det fører til, at mange flere individer derved får en bedre velfærd. Fordi det oftest er mennesker, som i første omgang nyder godt af den viden, som dyreforsøgene resulterer i, kan det være svært at se gevinsten for dyrene. Dog skal man huske, at forsøg med dyr også har givet dyrlæger meget af den viden og medicin, som de bruger til at hjælpe dyr, ligesom en lille del af den forskning som finder sted – eksempelvis i Zoologisk Have – udføres for at forstå dyrene endnu bedre, så man f.eks. bedre kan bevare arten i naturen.

Quiz

'Reduction' (reduktion) betyder:

- A** At man reducerer koncentrationen af medicin og giftige stoffer i dyreforsøg, sådan at dyrene for eksempel ikke forgiftes og dør på grund af forsøget.
- B** At man reducerer antallet af smertevoldende indgreb på forsøgsdyrene i de enkelte forsøg.
- C** At man i et dyreforsøg reducerer antallet af dyr, som skal bruges mest muligt, samtidig med at man søger for, at resultaterne fra forsøget bliver mindst lige så brugbare.

Mange lægger sig nok et sted mellem Rettigheds-etikkens og Nytteetikens yderpunkter og accepterer, at der udføres dyreforsøg, men kun under særlige omstændigheder. Måske lægger man vægt på, at den viden forsøgene giver os, skal gøre stor gavn, og ikke ville kunne opnås på anden måde. Og at man altid forsøger at begrænse antallet af forsøgsdyr og mindske smerte, lidelse og angst hos det enkelte forsøgsdyr. I så fald har man en holdning til dyreforsøg, som gør det naturligt, at vi i samfundet gør en indsats for at arbejde med 3R – at erstatte, reducere og forfine dyreforsøg.



Foto: Novo Nordisk



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

‘Replacement’ (erstatning) betyder:

- A** At man i et dyreforsøg vælger at erstatte større hvirveldyr som f.eks. hunde eller grise, med mindre hvirveldyr som mus, rotter eller fisk.
- B** At man aldrig bruger levende organismer til forsøg, kun computermøddeller eller cellekulturer.
- C** At man i forsøg erstatter levende, hele hvirveldyr med ikke-følede materiale, som for eksempel computermøddeller, cellekulturer, hvirvelløse dyr, planter eller mikroorganismer.

‘Refinement’ (forfinelse) betyder:

- A** At man designer forsøget sådan, at det kun er meget få dyr, som udsættes for de mest stressende/smertefulde trin i forsøget
- B** At man designer forsøget sådan, at de enkelte dyr oplever mindre stress, smerte eller andet ubehag, sammenlignet med andre dyreforsøg, som har samme formål.
- C** At man sørger for, at det kun er dyr, som ellers ville være blevet aflivet af andre grunde, som bruges i forsøget.

Love, regler og 3R

Lov om dyreforsøg og EU-forsøgsdyrs-direktivet:

I den danske 'Lov om Dyreforsøg' og 'EU-direktivet om forsøgsdyr' støder man på 3R-principper flere steder. Hvis man vil lave dyreforsøg, er det først og fremmest lovpligtigt at søge om tilladelse hos Dyreforsøgstilsynet. Som udgangspunkt får man ikke lov til at lave et dyreforsøg, hvis der findes dyrefri alternativer, som kan give samme viden (*Replacement*). Man skal bruge det mindst mulige antal dyr (*Reduction*). Samtidig skal dyrene udsættes for så lidt lidelse som muligt, bl.a. skal de om muligt bedøves under forsøg, og der skal tages hensyn til deres fysiologiske og adfærdsmæssige behov (*Refinement*).

Der stilles også krav om, at forsøget skal være til 'væsentlig gavn', og at værdien af forsøgets resultater skal afvejes i forhold til den belastning, som dyrene skal udsættes for. Når det drejer sig om produkter, som man ønsker at teste på forsøgsdyr, kan man skelne mellem om produktet er 'nice to have' eller 'need to have'. Ud fra den tankegang og et mangeårigt pres fra bl.a. dyreværnsforeninger, indførte man i 2013 et totalforbud i EU mod at bruge forsøgsdyr til at teste kosmetik.

Test af kemikalier og medicin

Til gengæld vedtog man i 2007 den europæiske kemikalielov REACH, hvis mål det er at teste tusindvis af stoffer i husholdnings- og industriprodukter, for at undersøge om de er sundheds- eller miljøskadelige. Medmindre der findes anerkendte dyrefri alternativer, skal stofferne under REACH testes på dyr. Dette fik dyreværnsorganisationer til at frygte, at millioner af forsøgsdyr skulle lide under kemikalietests. For at minimere brugen af forsøgsdyr kræver REACH dog, at data fra testede kemikalier gøres tilgængelige for andre, der laver dyreforsøg, så der ikke udføres overflødige dyreforsøg. REACH støtter også op om, at der udvikles dyrefri metoder, og metoder som reducerer og forfiner dyreforsøg.

Når et nyt dansk lægemiddel skal godkendes, skal Sundhedsstyrelsen sikre sig, at det både fungerer efter hensigten og er sikkert at bruge. På EU-plan er det EMA (*European Medicines Agency*), som udarbejder retningslinjer for de metoder, som man skal benytte til at teste lægemidler. Fordi al medicin, før det kan godkendes og sælges, skal være afprøvet på mennesker, er det et krav, at man inden da har testet det på dyr. Dyrefri alternativer kan bl.a. bruges til at sikkerhedsteste et stof, inden man foretager et dyreforsøg. Hvis medicinen under de indledende *in vitro*-forsøg viser sig at have skadelige effekter, kan man afbryde testene, så dyreforsøget ikke er nødvendigt at udføre.



Foto: Danmarks 3R-Center



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

Quiz

Hvad er in vitro- og in silico-metoder?

- A** Begge er eksempler på metoder, hvor man bruger levende forsøgsdyr til at undersøge, hvordan medicin eller kemikalier vil påvirke mennesker.
- B** I in vitro-forsøg undersøger man om stoffer er giftige. In silico-forsøg bruges derimod til at undersøge, om medicin vil virke som den skal på mennesker.
- C** I in vitro-metoder bruger man typisk dyrkede cellekulturer (i reagensglas), mens in silico-metoder f.eks. er computermødelier.

Fokus på forskning og formidling

Da dyrefri metoder på sigt kan spare os tid, penge og forsøgsdyrs liv, er både industri og myndigheder interesserede i dem. Der er dog den udfordring, at processen i at udvikle metoderne er meget tidskrævende. Før myndighederne godkender en metode, som erstatter et dyreforsøg, skal metoden først valideres. Det betyder, at man gennem forsøg bekræfter, at metoden er pålidelig i brug, og at resultaterne kan bruges i praksis, hvilket kan tage flere år. Inden da skal myndighederne selvfølgelig kende til metoden. En del store virksomheder udvikler selv 3R-metoder til egen brug. Lægemiddelindustrien har i de seneste år åbnet op for at dele denne viden med EMA (den europæiske medicinalmyndighed). På den måde kan gode 3R-metoder nemmere blive valideret af EMA, så de kan bruges rundt omkring i EU.

Mange lande har deres eget nationale 3R-Center, som støtter forskning og formidler om 3R. I 2013 blev Danmarks 3R-Center skabt i et samarbejde mellem Staten (Fødevareministeriet), tre medicinalvirksomheder og tre dyreværnsforeninger. 3R-Centeret har et sekretariat og en bestyrelse. Udover at formidle viden om 3R i Danmark, er en af 3R-Centerets store opgaver at støtte forskning i 3R og søge samarbejde med udenlandske centre. På den måde kan centeret både samle og sprede viden om 3R til borgere, universiteter, industri og myndigheder.



FIGUR 3: Danmarks 3R-Center spiller en central rolle i at samle og formidle viden om 3R til forskellige parter på forsøgsdyrsområdet (Illustration: Jens Bøgeskov).

Quiz

Hvad kan QSARs (Quantitative Structure-Activity-Relationships) bruges til?

- A** QSARs er en in vitro-metode, som ved hjælp af celtekulturer kan bruges til at kortlægge forskelle på menneskers og andre dyrs fysiologi.
- B** QSARs er en matematisk in silico-metode, som kan bruges til at forudsige sammenhænge mellem stoffers kemiske struktur og deres biologiske aktivitet – dvs. hvordan stoffer påvirker levende organismer.
- C** QSARs er in vivo-metoder, som ved hjælp af levende forsøgsdyr kan bruges til at forudsige, hvor hurtigt et stof nedbrydes og udskilles i mennesker.



LÆS MERE PÅ
3RCENTER.DK

Tid til et fjerde R?

Russell og Burchs 3R-principper tager udgangspunkt i forsøg, som allerede laves på dyr. Men som forsker kan man også vælge en anden indgangsvinkel i sit arbejde. Man står med et problem – noget man vil undersøge. Men hvad er den bedste metode til at få de ønskede data? Måske er forsøgsdyr slet ikke nødvendige i projektet. Et eksempel på dette er 'placental perfusion', som er en *ex vivo*-metode, hvor man bruger kvinders moderkager til at undersøge, om forskellige stoffer kan overføres fra moder til foster under graviditeten.

En sådan nyskabende tilgang, hvor man søger den bedste løsning på et problem, uden automatisk at tænke forsøgsdyr ind i løsningen fra start, er værdifuld både i forskningen og for at skåne forsøgsdyr. Måske har vi brug for at udvide vores 3R-principper med et ekstra R. Hvad dette fjerde R passende kunne kaldes, er man endnu ikke blevet enige om.

Måske har du en idé?



Appendix

**Immunisering af høns med
antigen i sprayform**

**Kunstig lungemodel kan
sikkerhedsteste spraymidler**

Immunisering af høns med antigen i sprayform

Undersøgelse af en smertefri metode til produktion af antistoffer i æg

Forskere fra Afdeling for Eksperimentel Medicin på Københavns Universitet er i gang med at undersøge en ny metode til produktion af polyklonale antistoffer i æg. Man vil forsøge at koble et udvalgt antigen på en af de vacciner, som alle kyllinger rutinemæssigt får mod sygdomme. Disse vacciner indånder kyllingerne i aerosolform, dvs. som forstøvet væske. Hvis metoden viser sig at fungere, vil den på sigt kunne spare millioner af forsøgsdyr for det ubehag og stress, som er forbundet med den normale praksis ved immunisering, hvor man sprøjter antigen ind i underhud eller muskel.

Antistoffer til mange formål

Produktion af antistoffer er et bioteknologisk område i vækst. Alene i USA menes det, at omsætningen indenfor antistofproduktion er op mod 3 milliarder dollars årligt. I dag bruger man f.eks. antistoffer til passiv immunisering mod forskellige infektionssygdomme, som modgift til toksiner fra slangebid og til diagnosticering og påvisning af forskellige stoffer i biologisk materiale. Mange af disse tests udføres i laboratorier, men antistoffer indgår også i håndkøbsprodukter, som f.eks. graviditetstests til urin.

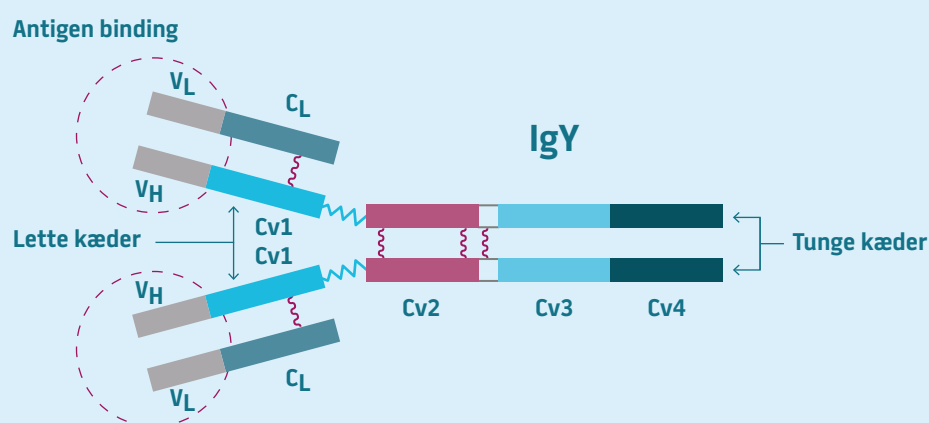
Det er immunforsvarets evne til at danne antistoffer mod overflademolekyler på skadelige mikroorganismer (antigener), som vi mennesker kan udnytte i antistofproduktionen. Vi kan stimulere immunforsvaret til at danne lige præcis de antistoffer, som vi har brug for. I denne produktion spiller forsøgsdyr en central rolle.

Hønseæg er fulde af antistoffer

Når man immuniserer dyr med et antigen, kan man senere tappe deres blod, som så indeholder antistoffer mod antigenet. Man bruger ofte pattedyr, som mus, kaniner og får til at danne de ønskede antistoffer. Men i de sidste årtier har høns, eller rettere, hønseæg, også vist sig som værdifulde i antistofproduktion. Hønseæg indeholder store mængder af antistof, da disse overføres fra hønen til dens kylling via æggeblommen. Faktisk kan æg fra en høne give mange gange mere antistof, end man kan få fra blodet i en kanin.

At pattedyr er tættere beslægtet med hinanden end med fugle, afspejles også i deres antistoffer. Både pattedyr og fugle danner flere forskellige typer af immunoglobuliner, men hvor pattedyr danner antistof af typen IgG, danner fugle deres egen variant, kaldet IgY. Når man skal producere antistoffer mod humane (eller andre pattedyrs-) proteiner til bioassays (tests), kan det være en fordel, at bruge høns, fordi der er større chance for en kraftig reaktion fra hønsens immunforsvar, dvs. der dannes hurtigt og effektivt IgY mod antigenet. Dette skyldes, at hønsens immunforsvar genkender flere epitoper på antigenet end et pattedyrs immunforsvar. I andre tilfælde, f.eks. til visse medicinske formål, er det dog pt. stadig nødvendigt at bruge IgG fra pattedyr.

Immuniseringen af dyrene sker ved indsprøjtninger i enten underhuden eller muskelvæv. For at få et godt respons fra immunsystemet, til-sætter man et hjælpemiddel, kaldet adjuvans, som stimulerer immun-systemet. Mange typer af adjuvans virker lokalirriterende, og vil derfor give svie og smerte i området, hvor man har stukket dyret. For senere at få fat i de dannede antistoffer i pattedyr, er man nødt til at tappe blod fra dem. Hver gang et dyr skal stikkes eller tappes, kræver det, at man fanger og holder fast i dyret, og det stresser dem. Ved at bruge hønseæg til produktion af antistoffer undgår man at skulle tappe blod fra dyret, og dermed er der allerede taget et skridt på vejen mod bedre dyrevelfærd for forsøgsdyr.



FIGUR 4: IgY

IgY og IgG har mange ligheder i deres struktur. På IgG er Cv2-regionerne på de tunge kæder erstattet af et 'hængsel-område' uden aminosyrer, som er bundet sammen af to disulfidbindinger. Det er med til at gøre IgG-molekylet mere bøjeligt end IgY.

(Copyright: Jens Bøgeskov)

Monoklonale og polyklonale antistoffer

Man skelner mellem to overordnede typer antistoffer i bioteknologien; de polyklonale og de monoklonale.

Polyklonale antistoffer:

Disse antistoffer kan stamme fra flere forskellige B-lymfocytter, hvilket medfører, at der vil være små forskelle i deres struktur og den måde, de binder sig til antigenet. Det skyldes, at et antigens overflade kan have flere områder (epitoper), som antistoffer kan hæfte sig til. Når man immuniserer et dyr aktiveres mange B-lymfocytter, og der vil derfor dannes antistoffer rettet mod forskellige epitoper på antigenet. Polyklonale antistoffer kan høstes direkte fra blod eller fra æggeblommer.

Monoklonale antistoffer:

Hvis man dyrker en enkelt lymfocyt, kan man danne mange kloner af identiske B-lymfocytter (celler, som alle stammer fra samme cellelinje). Disse kloner vil danne identiske immunoglobuliner (Ig), som derfor binder sig til den samme epitop på antigenet. Monoklonale antistoffer kan kun laves in vitro, ved en kompliceret proces, hvor man som udgangsmateriale skal bruge levende væv fra forsøgsdyr, f.eks. fra milten hos mus, til at isolere B-lymfocytter fra.



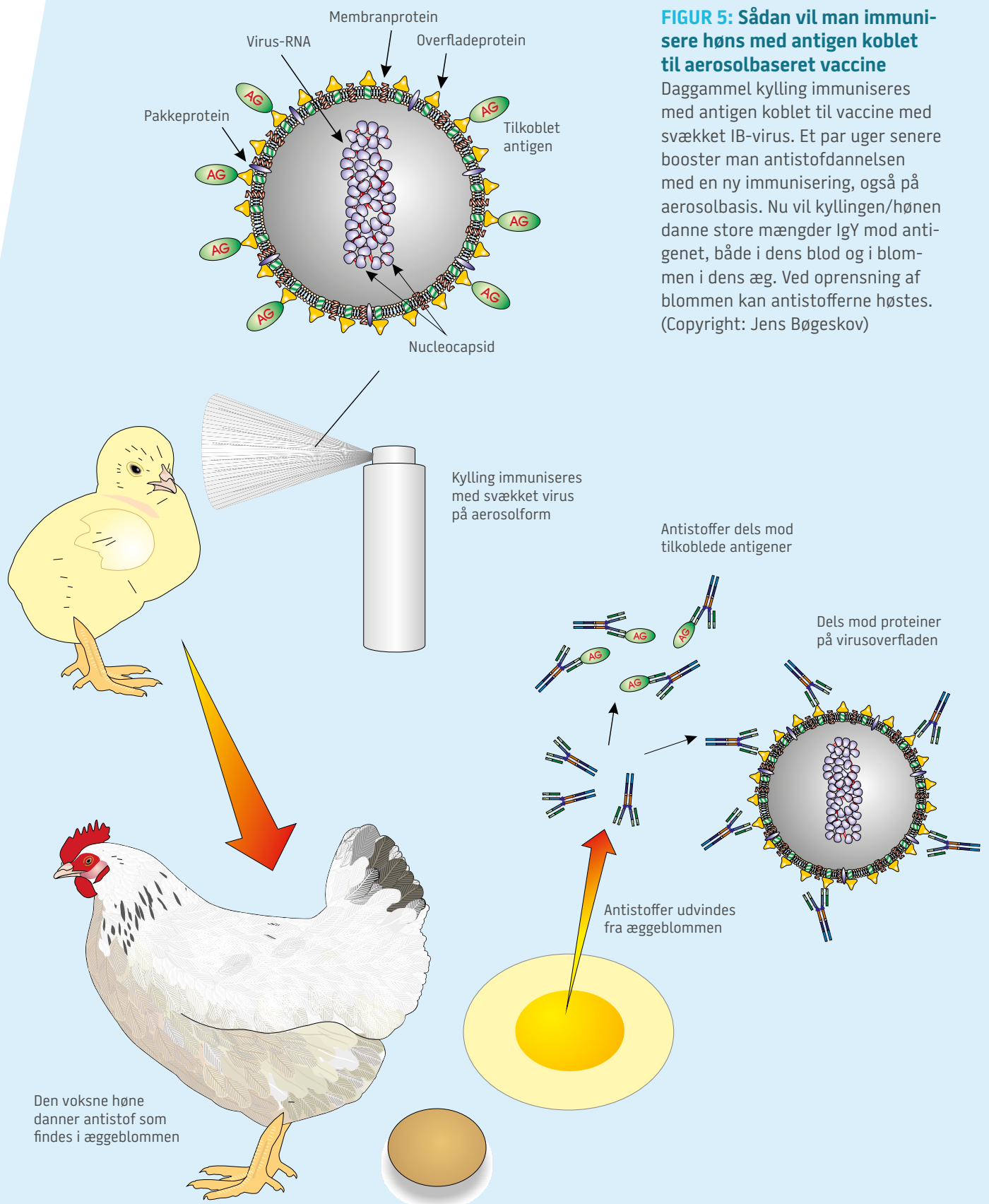
VIDEN OM
ANTISTOFFER

Ukendte faktorer udfordrer

I forsøget er der fem grupper af høner, som er fordelt tilfældigt. To af grupperne er kontrolgrupper, hvor den ene gruppe blot immuniseres med almindelig IB-vaccine på aerosol som kyllinger, mens den anden immuniseres med GFP i brystmuskelen, når de er voksne. To forsøgsgrupper får aerosol-vaccine med sammenkoblet GFP, hhv. med en høj og en lav GFP:virus ratio. Den sidste forsøgsgruppe af kyllinger får aerosolvaccine med GFP, dvs. hvor GFP ikke er kemisk sammenkoblet med den svækkede virus. Alle kyllinger vaccineres mere end en gang, for at få den ønskede respons fra immunforsvaret.

Når højerne begynder at lægge æg, kan man oprense/isolere antistoffer fra æggeblommen, og undersøge om der er dannet IgY mod GFP ved hjælp af en ELISA-test.

Et afgørende trin i projektet er at få koblet det udvalgte antigen, i form af proteinet Green Fluorescent Protein (GFP) på virus-partikler i vaccinen. Det er nødvendigt, fordi cellerne i luftvejenes indre overflade (endothel) er skabt til at beskytte os ved at lukke af for de fleste fremmede stoffer, som indåndes.



Infeksiøs Bronchitis (IB) virus, er en såkaldt Corona-virus, og lige præcis denne type vira kan trænge ind i blodbanen via lungerne. Forskerne vil derfor forsøge at lave en kemisk sammenkobling (konjugering) ved hjælp af stoffet succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoat, som kan koble antigenet (GFP) til glycoproteiner på viruspartiklens ydre membran. Fidusen ved at bruge GFP som antigen er, at proteinet er fluorescerende, dvs. lyser op, når man bestråler det med ultraviolet lys. Det vil hjælpe forskerne med at se, hvor meget GFP der er koblet til viruspartiklerne. Netop antallet af GFP per viruspartikel kan nemlig spille en vigtig rolle.

Hvis der er for få GFP-partikler koblet til virus, vil immunsystemet måske ikke stimuleres til at danne antistoffer, men er der for mange, vil virus måske ikke kunne passere gennem endothelcellerne. En anden usikkerhedsfaktor er, at man ikke ved særligt meget om de mekanismer, som er forbundet med at virus optages og replikeres i kroppens celler. Så det er på mange måder ganske spændende, hvad der vil ske, når man kobler GFP på virus.

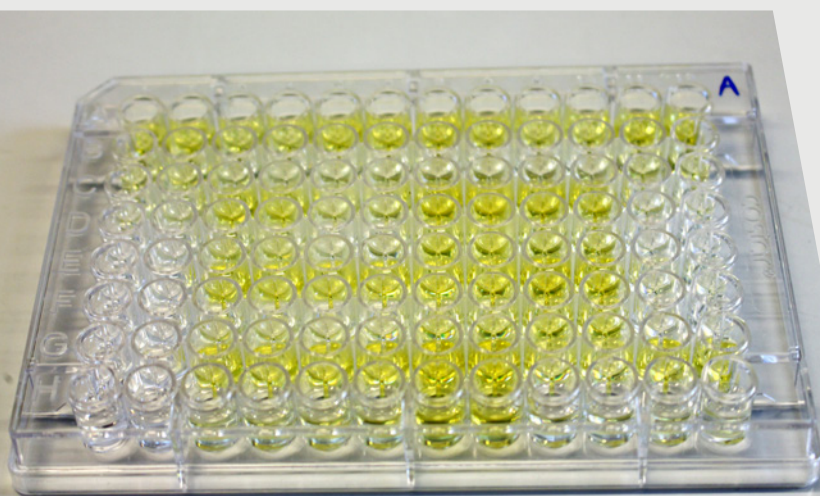


Foto: Danmarks 3R-Center

FIGUR 6: ELISA-test

Når æggeblommer fra forsøgets høner er blevet oprenset, kan en indirekte ELISA-test vise, om de indeholder antistoffer mod antigenet GFP. I brøndene er der påført GFP. Først tilsættes lidt oprenset æggeblomme, og derefter et sekundært antistof, som kan binde sig til antistof dannet mod GFP. Det sekundære antistof har fået tilkoblet et enzym, som katalyserer et farveskift ved at binde sig til et substrat i væsken i brønden. Ved hjælp af et spektrofotometer kan koncentrationen af antistoffet herefter bestemmes ud fra den målte absorptions.

Kunstig lungemodel kan sikkerhedsteste spraymidler

På Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø har forskere udviklet en dyrefri in vitro-metode som kan vise, om forskellige stoffer i sprayform skader lungernes surfaktant-lag. Dermed kan antallet af forsøgsdyr, som bruges til disse sikkerhedstests, reduceres.

Når du trækker vejret

Selvom vi trækker vejret mange gange i minuttet, tænker de færreste af os over det. Når man tager en indånding, suser atmosfærisk luft ned gennem luftrøret, bronkierne og bronkiolerne for at ende i alveolerne, som er de yderste forgreninger af lungerne. Her sker udvekslingen af gasser mellem blodet og luften, sådan at kroppens celler hele tiden får tilført ny ilt til respirationen og gennem udåndingen skiller sig af med kuldioxid. Uden denne proces kan cellerne – og dermed vi selv – ikke overleve. Derfor er det ikke så mærkeligt, at vi gennem evolutionen har udviklet mekanismer, som gør, at det føles ubehageligt, hvis vi prøver at holde vejret for længe, eller hvis vi indånder noget skadeligt.

For at vi kan passe på vores lunger, er det vigtigt at kende til de stoffer, som kan irritere og skade luftvejene. De fleste af os kender imprægneringsmidler fra dagligdagen. Det kan være produkter, som man bruger på sine sko, tøj, møbler eller gulve, for at gøre dem vand- og smudsafvisende. Mange af disse produkter sælges som sprayflasker, der indeholder væske under tryk og indeholder en opløsning med meget små dråber (mindre end 1µm i diameter). Denne type imprægneringsmidler er man særligt interesseret i at sikkerhedsteste, fordi man har set eksempler på, at nogle af dem kan være giftige, hvis de indåndes i for høj koncentration.



Foto: Søren Svendsen

FIGUR 7: Det er imprægneringsprodukter som disse, at forskerne undersøger.

Viden fra vejtrækningen

Målinger af vejtrækningens faser, fx fra dyreforsøg, kan ikke blot bruges til at afsløre, om et stof skader luftvejene, men kan også sige noget om typen og placeringen af skaden:

- **Irritation i øvre luftveje:** Stimulation af smertereceptorer i næse og øvre svælg medfører en forlænget TB-fase, dvs. perioden efter en indånding, før musen ånder ud igen – i praksis kan man se, at musen 'holder vejret'.
- **Irritation af nedre luftveje:** Når smertereceptorer i de nedre luftveje (luftrør og bronkier) aktiveres, ser man en forlænget TP-fase. Musen holder længere pause mellem åndedragene, næsten som om den forsøger at udskyde at trække vejret. Nogle gange vil musen vise et andet refleksmønster, hvor den trækker vejret hurtigt og overfladisk. Dette skyldes, at dens Tidal Volumen (VT) er nedsat, hvilket gør, at vejtrækningsfrekvensen øges, så cellerne kan få deres behov for ilt dækket.
- **Ødelagt surfaktant:** Hvis surfaktantlaget i alveolerne mangler eller er ødelagt, vil musen få et nedsat Tidal Volumen og et nedsat udåndingsflow (Expiratory Flow Rate; udåndingsvolumen per tidsenhed). Dette skyldes, at de mindste alveoler vil klappe sammen og de mindste bronkioler gradvist fyldes med væske, når musen ånder ud. Vejtrækningen bliver derfor overfladisk, og det føles som 'tungt arbejde' at trække vejret.



Når man skal undersøge, om stoffer skader lungerne ved indånding, bruger man ofte dyreforsøg, hvor fx mus fungerer som model for mennesket. Men på Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø har forskere udviklet en dyrefri in vitro-metode, som kan vise, om et stof i sprayform skader en vigtig del af lungerne, nemlig det såkaldte surfaktantlag i alveolerne. Med den nye metode håber man at kunne reducere brugen af forsøgsdyr til sikkerhedstests.

Partiklernes størrelse er vigtig

Når man skal undersøge eller forudsige, om et stof, som indåndes, kan skade luftvejene, spiller størrelsen af partiklerne en stor rolle. Groft sagt, er det de små partikler, som kan give os de største problemer.

Hvis der svæver partikler i luften omkring os, indånder vi dem, og jo mindre partiklerne er, jo længere kan de nå ned i luftvejene. Heldigvis er vores luftveje opbygget sådan, at de beskytter vores lunger. Når luften passerer gennem næsen/munden, og derefter gennem luftrøret, bronkier og bronkioler, opvarmes og fugtes luften, mens den passerer de mange sving og forgreninger. Dette effektive filter betyder, at partikler, som er større end ca. 10 μm (mikrometer), opfanges på deres rejse enten i næsen eller af bronkierne og bronkiolernes mange små fimrehår, cilierne. Fimrehårene i bronkierne transporterer partiklerne op i svælget, hvorefter de synkes.

En del af de partikler, som er mindre end 10 μm , vil nå helt ud i alveolerne, som er de yderste forgreninger af lungerne. Man ved også, at såkaldte nanopartikler, som er mindre end ca. 100 nm ($\leftarrow$ 0,1 mikrometer), som udgangspunkt altid kan nå ned til alveolerne, hvis de indåndes. Der er ingen fimrehår i alveolerne, så nanopartiklerne fjernes af makrofager (ædeceller), der fungerer som en slags skraldemænd. Makrofager optager partikler og bakterier, som derefter nedbrydes eller transporteres bort fra lungerne gennem lymfevæsken eller via bronkiolerne.

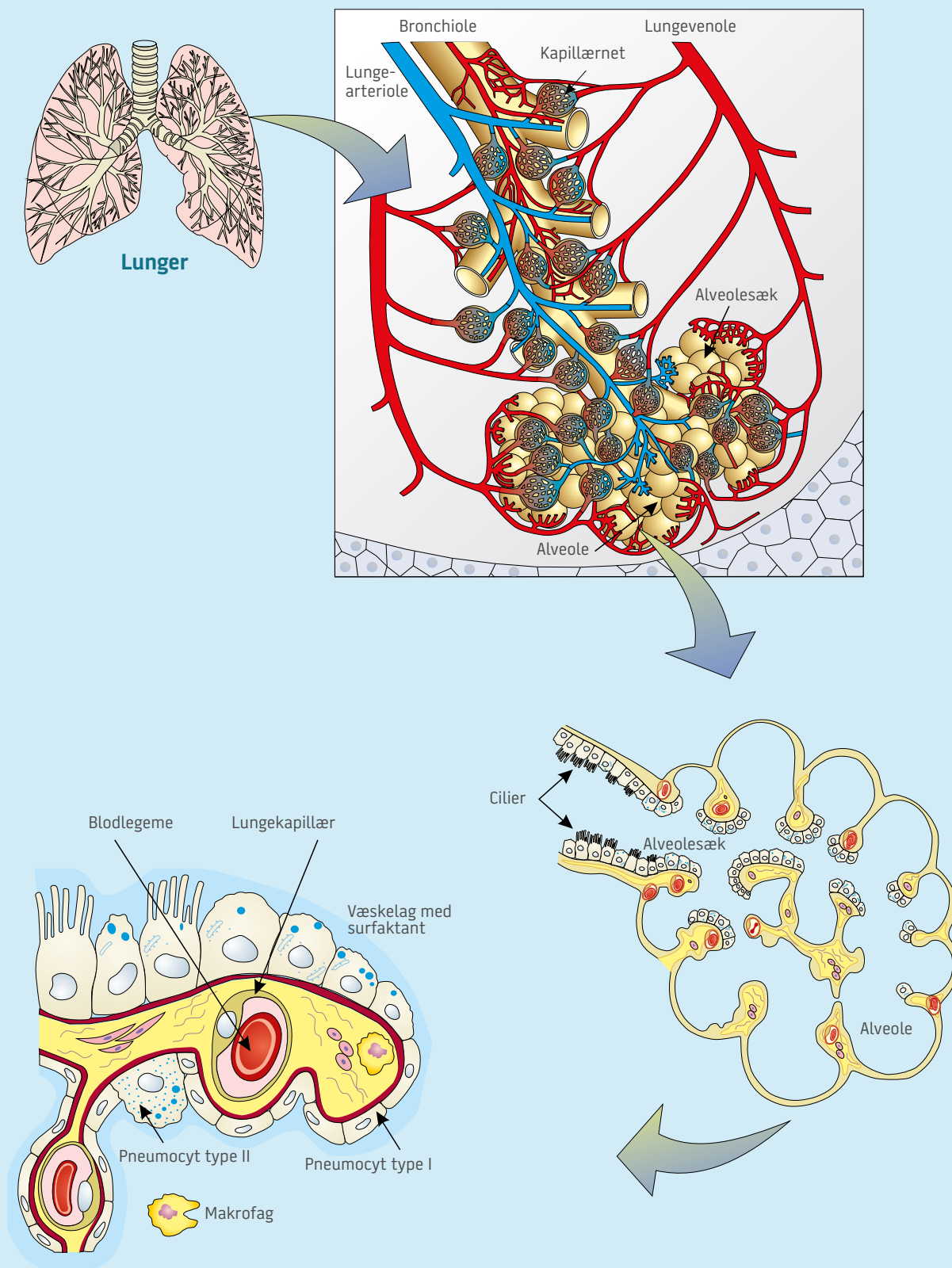
En makrofag fjerner kun en eller få partikler af gangen, så hvis der er mange små partikler, går det meget langsommere, end hvis der er få større partikler. Alveolerne er derfor sårbare overfor skadelige partikler.

Imprægneringsprodukter på aerosolform laver dråber, som er mindre end 1 μm . De er luftbårne i længere tid end partikler fra produkter på almindelig pumpeflaske. Det betyder, at flere dråber indåndes fra den sky, som udløses, når man bruger aerosolproduktet. Derfor er man også særlig opmærksom på at sikkerhedsteste aerosolprodukter.

FIGUR 8: På fotoet kan du se "den kunstige lunge", som forskerne vil bruge til at teste imprægneringsprodukternes farlighed.

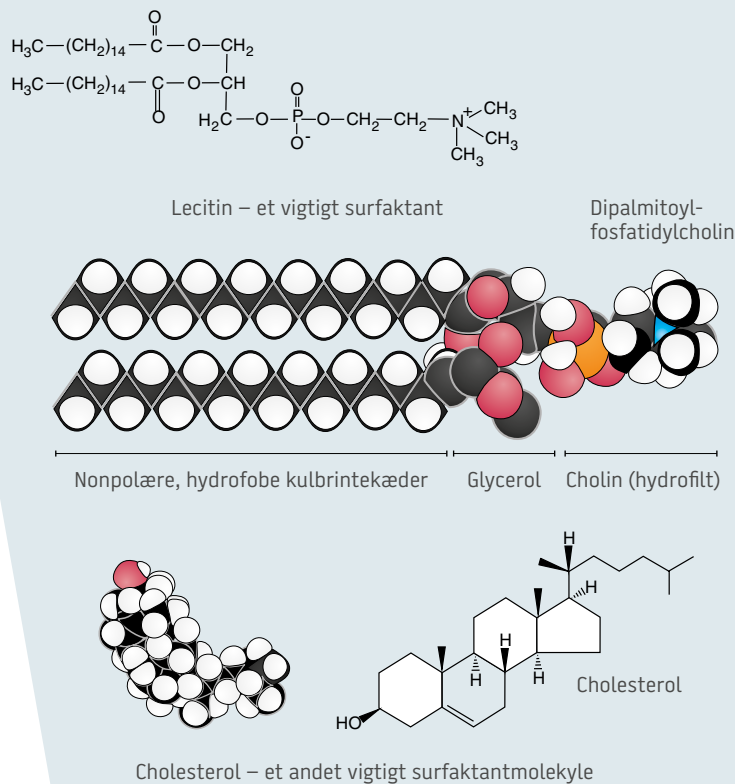


Foto: Danmarks 3R-Center



FIGUR 9: Lungernes opbygning

I alveolerne sker den livsvigtige udveksling af ilt og kuldioxid mellem blodkarrene og alveolernes luftrum. Alveolernes indre overflade består af et enkelt celledag med to typer celler: Type I- og II-pneumocytter. Det er type II-pneumocytterne, som producerer og udskiller den såkaldte surfaktant til væskelaget, som dækker indersiden af alveolerne. Surfaktanten hjælper med at holde alveolerne åbne under udånding, sådan at man kan trække vejret uden at bruge for mange kræfter (Copyright Jens Bøgeskov).

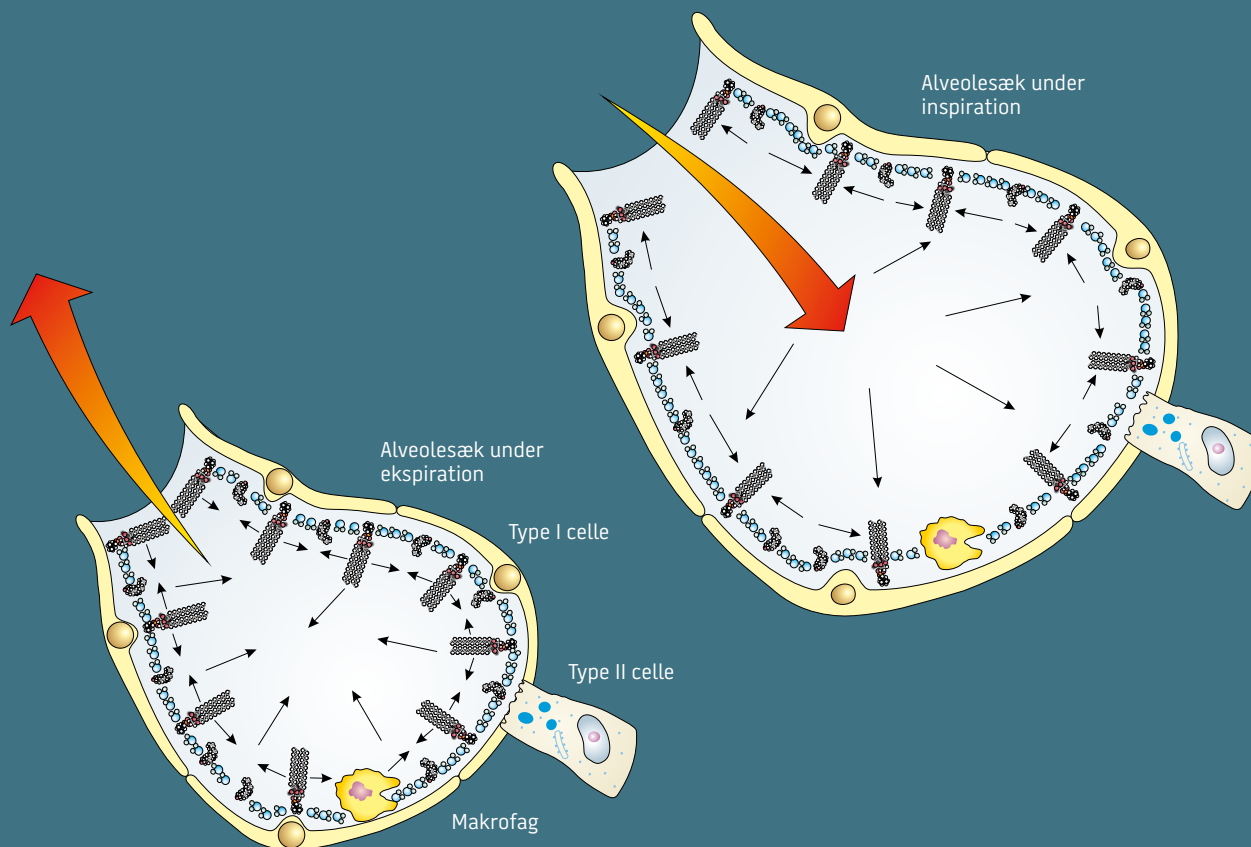


Surfaktantlaget

I hver lunge har vi omkring 300 millioner alveoler, som hver især kun er cirka 200 μm i diameter. Alveolernes indre overflade er dækket af et væskelag, som indeholder lungesurfaktant. Voksne mennesker har kun ca. 10-20 mL lungesurfaktant, så væskefilmen i alveolerne er meget tynd (0,2 μm). Hvis man foldede alle dele af luftvejene ud, ville man få en overflade på omtrent 100 m^2 , og langt det meste af arealet ville udgøres af alveoler. Den store overflade sikrer, at diffusionen af ilt og kuldioxid ind og ud af alveolerne foregår effektivt og hurtigt. Her spiller surfaktant en afgørende rolle for, at vores lunger fungerer.

I 1990'erne opdagede man, at den væsentligste årsag til at børn der var født tidligere end uge 34 døde, var, at de blev overbelastede, når de forsøgte at trække vejret, fordi deres lunger havde for lidt eller næsten ingen lungesurfaktant. Man ved i dag, at mange personer har nedsat lungesurfaktantfunktion, som følge af lungesygdom. Dette sker blandt andet ved ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), som kan opstå, når man udsættes for fx traumer, sepsis (blodforgiftning) eller hvis man inhalerer giftige kemikalier m.fl. Lungesurfaktantens funktion spiller også en rolle i sygdomme som astma, KOL og lungebetændelse.

Surfaktantlaget er en kompleks blanding af lipider og proteiner, som reducerer overfladespændingen på væskefilmen (se figur 10). Overfladespænding opstår, fordi molekylerne i en væske tiltrækkes af hinanden. Det er overfladespændingen, der holder sammen på en dråbe. I rent vand er overfladespændingen 70 mN/m (millinewton per meter), men i alveolerne er den væsentligt lavere. Det skyldes, at væskelaget indeholder surfaktant. Alveolens størrelse ændrer sig desuden i takt med, at man ånder ind eller ud. Når man ånder ud, bringes væggene i alveolerne tættere på hinanden. Hvis overfladespændingen var lige så høj, som i rent vand, ville de klappe sammen. Lungesurfaktanten sænker overfladespændingen til nærmest 0 mN/m under en udånding, så selv meget små alveoler kan holdes åbne (se figur 11).

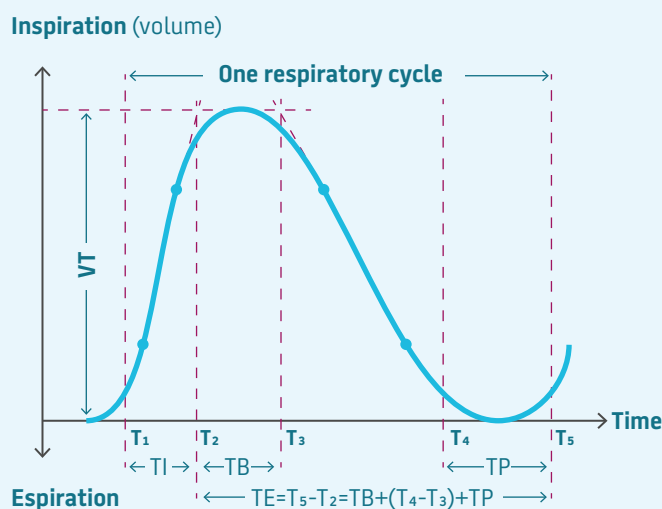


FIGUR 11: Overfladespænding

Trykket, som holder sammen på en dråbe vand, er større i en mindre dråbe end i en større dråbe. Så hvis væsken i alveolerne bestod af rent vand, ville væskelaget i en tømt/'lille' alveole (efter en udånding) have større tendens til at samle sig, og dermed sammentrække alveolens indre vægge, end væskelaget i en udvidet alveole. Surfactantens evne til at nedsætte overfladespændingen stiger, når alveolens størrelse falder. På den måde modvirker et fungerende lag af surfaktant at alveolen klapper sammen (Copyright Jens Bøgeskov).

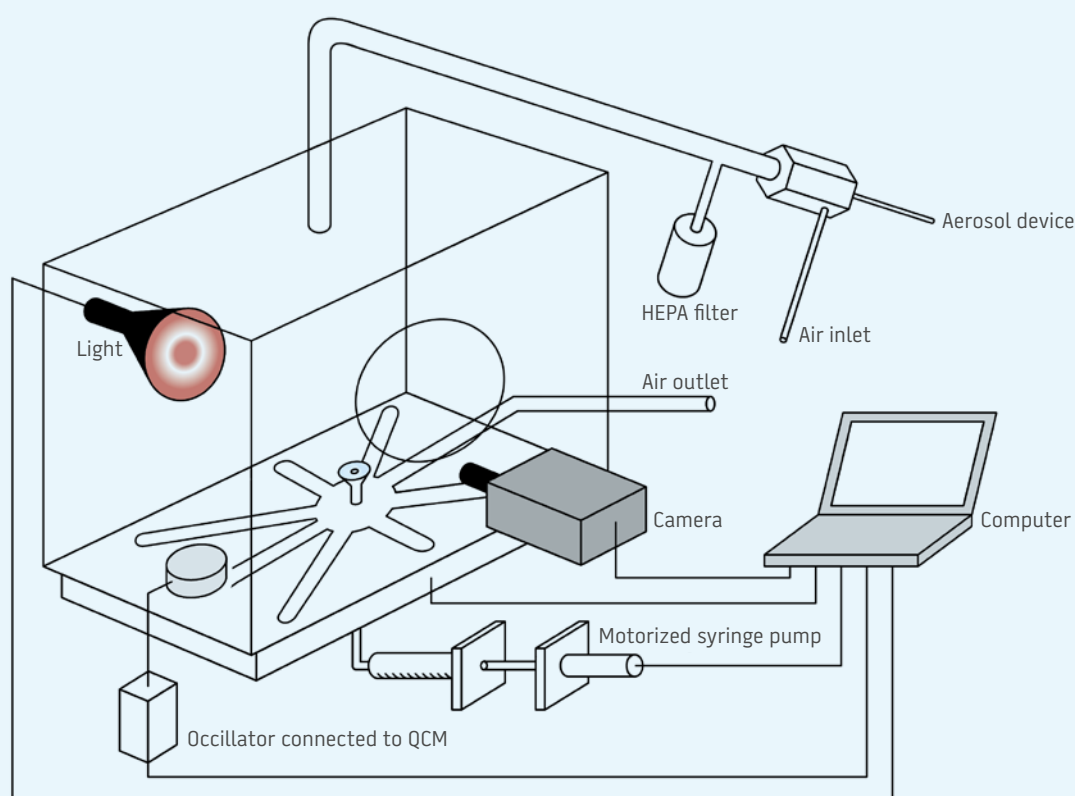
Det betyder, at vi skal bruge meget få kræfter på at trække vejret. Hvis lungesurfaktanten derimod er beskadiget, fx på grund af indånding af noget giftigt, sænkes overfladespændingen ikke til disse meget lave værdier, og de mindste alveoler vil kollapse rundt omkring i lungerne. Det vil medføre, at nogle af de yderste bronkioler fyldes med væske.

Det kræver mange kræfter at åbne alveolerne og fjerne væsken fra bronkiolerne, og man vil trække vejret tungt og med besvær. I værste fald kan skader på surfaktanten føre til, at lungerne klapper sammen (såkaldt atelaktase), hvilket er en livsfarlig tilstand.



FIGUR 12: Vejtrækningens faser

Når man tager en indånding stiger Tidal Volumen (VT). Når man herefter laver en udånding falder VT igen. Når man undersøger om stoffer er giftige ved indånding, kigger man typisk på Tidal Volumen samt vejtrækningsfrekvensen og udåndingsflowet (Expiratory Flow Rate) hos mus. Resultaterne fra mus bruges til at forudsige, om menneskers luftveje også vil reagere på de undersøgte stoffer. Figuren vises med tilladelse fra: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2005, 96, 420–428: Mechanisms of Acute Inhalation Effects of (π) and (a)-a-Pinene in BALB/c Mice.



FIGUR 13: Den kunstige lungemodel

Den kunstige lungemodel, CDS (Constrained Drop Surfactometer) er et lufttæt kammer, hvori der kan sprøjtes kontrollerede mængder aerosol ind. En motoriseret pumpe kan ændre størrelsen på en dråbe, som hviler på piedestalen i bundpladen. Dråbens form optages på film af kameraet, som er koblet til en computer.

Figuren vises med tilladelse fra: The American Thoracic Society: American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology Volume 54 Number 3 | March 2016: A Proposed In Vitro Method to Assess Effects of Inhaled Particles on Lung Surfactant Function, Jorid B. Sørli, Emilie Da Silva, Per Bäckman, Marcus Levin, Birthe L. Thomsen, Ismo K. Koponen and Søren T. Larsen.

Dråbe som in vitro-model

Den kunstige in vitro-lungemodel, som forskere fra Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø har udviklet, kan bruges til at sikkerhedsteste stoffer, som man mistænker for, at kunne skade surfaktanten. Modellen kan simulere alveolers surfaktantfunktion under ind- og udånding (se figur 8).

I korte træk består modellen af et lufttæt kammer med en vanddråbe tilsat surfaktant, som ligger ovenpå en forhøjning. Dråbens størrelse kontrolleres ved hjælp af en pumpe, som gør dråben større (for at simulere alveolens størrelse og overfladespænding ved en indånding) eller mindre (udånding). Det stof, man gerne vil undersøge, sprayes ind i kammeret. Et videokamera optager herefter løbende ændringerne i dråbens form. Hvis surfaktantens funktion ødelægges, vil formen på dråben ændre sig, fordi overfladespændingen stiger.

De første forsøg med modellen har haft til formål at undersøge, om modellen nu også kunne bruges i praksis. Man har derfor testet med stoffer, som man allerede havde viden om mht. deres effekt på surfaktanten. Her har modellen vist sig at være meget pålidelig. Da man ved, at dyreforsøg, hvori fx imprægneringssprayprodukter indåndes, er voldsomt belastende for mus, vil det være en stor dyrevelfærdsmæssig forbedring, hvis man kan reducere antallet af nødvendige dyr til disse tests.

Idet modellen kun kan forudsige giftighed med hensyn til surfaktantens funktion, og ikke andre typer af skader på luftvejene, kan den ikke i sig selv fuldt erstatte forsøgsdyr, når man skal sikkerhedsteste aerosoler. Men håbet er, at den vil kunne reducere behovet for at bruge forsøgsdyr i tests, hvor man mistænker et stof for, at kunne skade surfaktanten.



Foto: Danmarks 3R-Center

FIGUR 14: Test af imprægneringsmidler

Aerosolkammer til mus. Musene sidder i hvert deres rør, med hovedet pegende ind mod kammerets midte. Den aerosol, som man ønsker at teste, sprøjtes herefter ind i kammeret. Musenes vejrtrækningsmønster registreres af et spirometer, som aflæser trykændringer i luften rundt om musens krop, som opstår ved ind- og udånding. De nuværende guidelines fra OECD foreskriver, at man tester med ret høje koncentrationer (op til 5g/m³) i op til fire timer.

Dyreforsøg og alternativer

1. udgave, 1. oplag, 2019

© 2019 Danmarks 3R-Center og Fødevarestyrelsen

Redaktion: Aiko Sho Nielsen, freelancejournalist og lektor i biologi

Grafisk tilrettelæggelse: ESSENSEN®

Tryk: GP-Tryk A/S

Forsidefoto: Danmarks 3R-Center/Novo Nordisk

ISBN: 978-87-93147-30-97

Tilhørende hjemmeside: 3rcenter.dk

Her er der supplerende materiale og lærervejledning.

Bestil et gratis klassesæt:

Send en mail med navn og adresse til

15@fvst.dk. Skriv 'Forsøgsdyr' i emnefeltet.

Kort om Danmarks 3R-Center

Danmarks 3R-Center er et samarbejde mellem Miljø- og Fødevareministeriet, Dyrenes Beskyttelse, Dyreværnsorganisationernes Samarbejdsorganisation (DOSO), LEO Pharma, Lundbeck og Novo Nordisk. Danmarks 3R-Center arbejder for at fremme de 3R'er i Danmark og dermed sætte fokus på alternativer til dyreforsøg og skabe endnu bedre forhold for forsøgsdyrene.

Om denne bog

Bogen er tiltænkt de gymnasiale uddannelser i fagene Biologi og Bioteknologi og kan bruges til klasseundervisning, emnearbejder og faglig læsning. Bogen indledes med en baggrundsartikel og nogle små opgaver, som skal bidrage med en generel viden om forsøgsdyr og de 3R'er.

Herefter følger et appendix med to dybtgående artikler, som er tiltænkt højniveau.

På 3rcenter.dk er der supplerende materialer samt en lærervejledning.

