

Datum ontvangst DEC 7-6-2006

DEC nr 2148

## DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

## AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk 7 werkdagen voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

[redacted]

[redacted]

E-mail: gaastra@voed[redacted]

telefoon: [redacted] / fax: [redacted]

Instituut: TNO DV locatie Rijswijk

## ALGEMEEN

1. Titel van het onderzoeksplan: Evalueren van een diervorm voor post traumatisch stress disorder.

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze diervorm deel uitmaakt (indien van toepassing):

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [redacted]

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr: [redacted] (of tst [redacted])

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [redacted] (allen ex art. 12) en [redacted] en [redacted] (beiden ex art. 9).

Externe samenwerking (indien van toepassing): de histologie vindt plaats [redacted]

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: medio juli 2006

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail: [redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: Deze studie heeft een duur van 5 maanden.

Locatie waar dieren worden gehouden: [redacted]

4. Codenummers\* volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:

| groep | < kolommen > |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |
|-------|--------------|----|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|----|
|       | 1            | 2  | 3 | 4 | 5  | 6 | 7 | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1     | 1            | 32 | 6 | 5 | 32 | 1 | 1 | 01 | 01 | 4  | 1  | 2  | 1  |
| 2     | 1            | 32 | 6 | 5 | 32 | 1 | 1 | 01 | 01 | 4  | 4  | 3  | 1  |

## RELEVANTIE

### 5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:

De mogelijkheid om te leren en onthouden van nieuwe informatie is de meest cruciale component van ons cognitief leven. In stress en angstvolle situaties blijken de leer functies het beste te werken. Echter, sommige mensen onder extreme omstandigheden kunnen pathologische condities ontwikkelen wat we post-traumatic stress disorder (PTSD) noemen. Dit vertaalt zich in een misplaatste aanwezigheid van herinneringen waardoor de betreffende persoon niet meer normaal kan functioneren.

PTSD is een extreme vorm van de reactie van het lichaam op stressvolle of traumatische gebeurtenissen. Veelal berusten deze gebeurtenissen op de machteloosheid tijdens het voorval. Het zien van een ongeluk waarbij jezelf geen invloed kan uitoefenen is zo'n voorbeeld. Het blijkt dat m.n. militairen die uitgezonden zijn voor actieve militaire operaties maar ook voor peace keeping operaties een grote kans hebben om PTSD te ontwikkelen. 31% van de mannelijke en 27% van de vrouwelijke veteranen van de Vietnam oorlog blijken aan PTSD te lijden. Meer recentelijk blijkt dat een groot deel van de uitgezonden militairen, 19 % van de Irak oorlog, 11 % van de Afghanistan oorlog en 8% van andere peace keeping missies, geregistreerd staan met psychische klachten gerelateerd aan stress. Bij 15% van deze mensen is inmiddels PTSD gediagnosticeerd. Aangezien er voor PTSD kennis over het onderliggende mechanisme ontbreekt, is dier experimenteel onderzoek naar PTSD een van de belangrijkste onderwerpen om meer over PTSD en het mechanisme te weten te komen. Dit inzicht kan vervolgens dienen om doeltreffende therapieën te ontwikkelen voor de behandeling van PTSD.

Aangezien PTSD moeilijk te karakteriseren is en goede biomarkers gekoppeld aan het onderliggende mechanisme ontbreken, is het onderzoek naar gevalideerde markers een van de belangrijkste aspecten om meer over PTSD en het mechanisme te weten te komen. Daarnaast kunnen deze markers dienen om doeltreffende therapieën te ontwikkelen voor de behandeling van PTSD. Het heeft bovendien een substantiële positieve impact op de wijze waarop patiënten ingeschat kunnen worden en gediagnosticeerd in de kliniek.

In vivo, non-invasieve neuroimaging technologie naast begeleidende sophisticated analyses over het mechanisme binnen verschillende species, wordt geleidelijk aan erkend voor innovatieve identificatie en validatie van nieuwe testmodellen en biomarkers om binnen PTSD toe te passen en voor de voorspellende klinische uitkomst. Twee non-invasieve neuroimaging technieken zijn slaap ritme en de 'event related potential' (ERP) in het EEG. De ERP vindt bijvoorbeeld plaats na het aanbieden van een toon die gerelateerd is aan een positief dan wel negatief of neutraal vervolg. Stel een toon met frequentie "x" levert een beloning op, dan reageert het brein hier anders op dan na een toon met frequentie "z" die geen beloning tot gevolg heeft. Dit is nog sterker als de toon voorafgaat door een handeling waarbij een keuze gemaakt moet worden. De goede keuze levert toon "x" op en de foute keuze levert toon "z" op. Deze methode is heel goed bruikbaar in de humane klinische benadering voor het aantonen van de cognitieve verstoringen. Door het aantonen dat deze toepassing ook werkt binnen een aanverwant diermodel is het mogelijk om een directe vertaalslag van het dierexperimentele werk naar de kliniek te maken.

De meest gangbare modellen voor PTSD zijn de 'inescapable foot shock paradigm' in ratten en de 'social defeat' procedure waarbij een rat in het territorium van een andere rat wordt geplaatst voor een korte tijd. De rat is een goed model om meer over het mechanisme te weten te komen zoals veranderingen op hersenstructuur niveau (zoals hippocampus veranderingen) en op synaptisch niveau (connectiviteit) en neuronaal niveau (dendriten vorming). Echter voor de functionele aspecten zoals cognitie, slaap, depressief gedrag etc komt een diermodel dicht bij de mens meer in aanmerking. Deze translationele benadering van het onderzoek (rat-marmoset-mens) is beschreven in een aanvraag voor de USArmy waarbij een samenwerking zal zijn met het Centraal Militair Hospitaal die effecten op mensen gaat onderzoeken (de Nederlandse soldaten die uitgezonden zijn in Afghanistan). Dat onderzoek wordt

gesteund door de Nederlandse ministerie van Defensie. De hypothese, deliverables en technical objectives van dat voorstel voor de studie die start in 2007 heb ik in onderstaande Box 1 toegevoegd.

In de marmosetaap willen we de functionele aspecten van PTSD op een zo reëel mogelijke wijze benaderen. Hiervoor hebben we gekozen voor het isolatieprotocol welke ook is toegepast voor studie met DEC nummer 1374 gecombineerd met het 'social defeat' protocol tijdens de tweede week van de isolatie periode. De aap wordt dan voor een korte periode in de verblijfskooi van een ander aapje van hetzelfde geslacht geplaatst.

Van deze benadering willen we de uitwerking verifiëren op gedragsaspecten (observatie technieken zoals zijn uitgevoerd binnen DEC no. 1374 (zie bijlage 1 achterin), startle response, slaap EEG, 'event related potential' (ERP), cognitie, loco-motor activiteit en home cage activiteit). Dit willen we testen in twee groepen dieren: een waarbij de inductie van PTSD plaatsvindt en een groep als controle groep. Het gedrag van de dieren wordt gevolgd voor een periode van 2 maanden. Na afloop worden onder inhalatie narcose de hersenen verwijderd voor histologisch onderzoek waarbij met name de hippocampus structuur wordt onderzocht. De nieuwe marker in deze aanpak is de ERP, waarbij tijdens een cognitieve taakverrichting in het CANTAB systeem (zie DEC 1705) het EEG wordt geregistreerd.

Deze benadering ondersteunt het optimaal gebruiken van cross-species karakteristieken door de integratie van niet invasieve biochemische parameters, gedrag en hersenactiviteit via EEG metingen, welke toegepast kunnen worden op dieren en op mensen. Deze benadering positioneert het onderzoek ideaal binnen het framework van translationeel onderzoek waardoor de extrapolatie van informatie en effecten optimaal kan plaatsvinden van het laboratorium onderzoeksveld naar de kliniek en vice versa. Dit is van belang om ons begrip over de biologie van PTSD en de behandeling hiertegen beter te kunnen bevatten en doorgronden.

#### *Box 1*

**Hypothesis:** This study will focus within the framework of translational aspects in the research towards the mechanisms of the disadvantageous effects of stress, leading to PTSD. We will optimally use the cross-species characteristics by integration of the mechanistic disturbance with symptoms and functional disorders, which can be applied to animals and humans alike.

The potential of in vivo, non-invasive neuroimaging technology and concomitant sophisticated analysis across species is progressively recognized for innovative identification and validation of new models, biomarkers, or even surrogate endpoint markers for use within PTSD. These biomarkers/models will help to formulate more precise hypotheses on neural substrates and processes underlying PTSD and on possibilities for pharmacological treatment thereof.

The hypothesis is that the effects are partly a result of direct effects of corticosteroid hormones and partly the result of an endogenous excitotoxicity, i.e. one basically destroys, and has destroyed, its own neurons by endogenously generated activity, combined with a problem in the homeostatic control of the neurons and glia. There is obviously a disbalance in neurogenesis and homeostatic maintenance processes. Therefore the hypotheses are:

- 1) We want to show the correlation of the effects between different disciplinary levels after traumatic events in human. This will be validated by the extent in which these parameters can be modulated with pharmacological agents and psychotherapeutic procedures. The parameters we are going to test are the psychoendocrinological response, the neuropsychological function and sleep, the morphometry of the cortex and relevant area's in the brain, the functional network in which traumatic memories are stored and the pain threshold by fMRI.
- 2) The translational approach from rat to monkey to human helps to get insight in the neural substrates and processes underlying PTSD and will help to predict the therapeutic out-come after modulation and intervening in the mechanism in the clinical setting.
- 3) Exposure to traumatic events strengthens hippocampal synaptic efficacy via modulation of key mechanisms that underlie synaptic transmission. Moreover, we predict that these alterations are mediated via activation of GRs, and that GR antagonists prevent stress-induced alterations in synaptic transmission, synaptic plasticity and working memory. Alternatively, glucocorticoid agonists when applied before re-exposure to (aspects of) a traumatic experience may reduce fear memories.
- 4) Severe stress may lead to changes in the (innate) immune system (microglia, cytokines, chemokines, T-cells) of the CNS. Alterations in microglia functioning and changes in CNS levels of pro-inflammatory cytokines will affect neuronal functioning and structure. In particular, we want to investigate to what extent alterations in the immune system of the brain following severe stress contributes to the behavioral phenotype (in animals) or the PTSD symptoms (in humans).

**Deliverables**

- a) A research model for measuring therapeutic interventions on the functional outcome of PTSD focussed on sleep, cognition, clinical symptoms with a high translation character.
- b) Valid markers for diagnostic and therapeutic application
- c) New insights in how corticosteroid hormones modulate information processing in the brain thereby providing a bridge to corticosteroid effects on learning and memory processes in health and disease.
- d) Insight in protective and destructive immunity in the CNS and its role in PTSD.
- e) Evidence for the applicability of intervention in non-human primates
- f) Demonstration of the usefulness of this approach in a clinical setting

**Technical objectives**

In human, we will assess the psychoendocrinological response to acute traumatic stress according to the state-of-the-science and the relationship of the psychoneuroendocrine response in response to pharmacological and non-pharmacological stressors. The neuroendocrinological functions will be compared to sleep parameters in patients with PTSD which can be translated to animal research. In the same way we will also assess neuropsychological function in PTSD, trauma controls and a population of healthy controls. This includes assessment of memory and concentration. Thereafter, the extent in which storage of aversive or traumatic memories are stored will be assessed by modulation with pharmacological agents and psychotherapeutic procedures. Furthermore, brain imaging techniques will help to assess the functional network in which traumatic memories are stored and to measure cortical thickness and other affected brain structures and to assess pain processing. Both pain threshold and sensitivity will be examined.

We will develop experimental models both in rats and marmoset monkeys linking the functional outcome and symptoms of PTSD with the biological changes in the brain. This translation model combined with clinical information can give new insight in the mechanism leading to PTSD.

We will examine whether exposure to a traumatic experience alters synaptic transmission and synaptic plasticity. We will assess the mechanism of action, at the cellular and molecular level, by which corticosterone alters i) AMPA-receptor mediated synaptic transmission and ii) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity. In addition we will examine how high cortisol levels affect T-cell and microglia function in the CNS.

Recent evidence shows that the memory for traumatic events becomes labile upon re-exposure to the traumatic event. In particular intra-hippocampal infusions of the protein synthesis inhibitor anisomycin cause amnesia for a consolidated hippocampal-dependent contextual fear memory, but only if the memory is reactivated prior to infusion. Moreover, preventing pre-synaptic norepinephrine release with alpha2-adrenergic agonists, or blocking post-synaptic norepinephrine receptors with beta-adrenergic antagonists is hypothesized to reduce hormonally enhanced memories. We will use this knowledge to assess whether clinically relevant manipulations upon re-exposure reduces the traumatic memory, and improves working memory as well as its underlying substrate.

**6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):**

**6.a Maatschappelijk belang:**

**6.a.1 Gezondheid mens/dier**

Stress gerelateerde aandoeningen waaronder PTSD vormen een toenemende problematiek in de Westerse wereld en heeft een enorme impact op de kwaliteit van leven van de patiënt.

Volgens de NIMH website lijdt 3,6 % van de mensen tussen de 18 en 54 jaar aan PTSD.

Ongeveer 22,5 % van de mannen en 21,2 % van de vrouwen krijgen tijdens hun leven te maken met een partiele PTSD. Daarnaast blijkt dat vluchtelingen in de Westerse wereld een 10x zo hoge kans hebben om PTSD te ontwikkelen. Om de impact van PTSD te beperken is een vroege diagnose gevolgd door een neuroprotectieve behandeling een goede strategie.

Daarom is het van belang om een goed en relevant diermodel te hebben die de link tussen het mechanisme van de therapie naar de therapeutische uitkomst op het ziektebeeld kan vertalen, en te beschikken over geschikte markers binnen het experimentele onderzoek.

**6.a.2 Economisch belang**

**6.a.3 Milieu belang**

**6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3**

**6.b Wetenschappelijk belang:**

Bij het beantwoorden van deze vraag verwijs ik naar punt 5. Het ontwikkelen van een relevant diermodel voor PTSD in een met de mens verwant diersoort biedt mogelijkheden om het achterliggende mechanisme van PTSD te gaan onderzoeken. De overeenkomsten op functionele veranderingen veroorzaakt door PTSD tussen de mens en het diermodel biedt hiervoor deze mogelijkheden. Deze benadering zal het gat dichten

tussen het onderzoek naar het achterliggende mechanisme, wat heel goed in ratten uitgevoerd kan worden, en het klinische verloop van deze aandoening in de mens. De uitleesmethodes zullen dienst doen als markers voor PTSD waarbij ze als link zullen dienen tussen de humane situatie en het onderzoek naar het achterliggende mechanisme. Dit laatste onderzoeksaspect is geen onderdeel van deze aanvraag.

**7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?**

**Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?**

De wetenschappelijke kwaliteit is beoordeeld door [REDACTED] van [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] die gespecialiseerd is op het onderliggende mechanisme bij stress, [REDACTED] verbonden aan [REDACTED] [REDACTED] (hij is 'principle investigator' van een 10 jarig onderzoekstraject op gebied van PTSD), en [REDACTED] verbonden aan [REDACTED] [REDACTED] van [REDACTED]. Het idee voor dit onderzoek is in overleg met deze specialisten opgesteld. Dit onderdeel van model ontwikkeling zal deel uitmaken van een grote studie die in 2007 staat gepland welke gefinancierd zal worden door [REDACTED]. Dit project wordt tevens gesteund door de Nederlandse overheid, directie TNO [REDACTED] en het management van de Businessunit [REDACTED] waar deze opdracht wordt uitgevoerd.

**PROEFOPZET**

**8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn):**

- ☒ nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☒ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, in DEC-advies nr.: 1705 zijn de dieren reeds opgetraind in het CANTAB test systeem. Deze taakverrichting zal onderdeel zijn van de studie met als aanvulling de EEG analyse. De reeds getrainde dieren van DEC 1705 zullen daarom in deze studie worden ingezet. Het isolatie protocol is eveneens eerder uitgevoerd in de studie met DEC-advies nr.: 1374.
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:  
wettelijke eis:  
testrichtlijn:
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

**9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen?**

Achtergrond informatie over de aapjes:

De overcomplete tien aapjes uit de studie met DEC no. 1705 zullen gebruikt worden. Deze aapjes zijn reeds getraind met het CANTAB systeem. Het CANTAB systeem is een systeem voor het meten van cognitieve functies welke gebruik maakt van een computer "touch screen". Deze testopstelling is oorspronkelijk ontwikkeld voor mensen en vervolgens aangepast en gevalideerd voor de marmosetaap. Het betreft een mobiele opstelling die tijdens een training- of testsessie voor de verblijfskooi gereden kan worden. Op het 'touch screen' verschijnen verschillende symbolen. De aap zal vrijwillig een keuze tussen de verschillende symbolen maken door het aanraken van het scherm. Goede keuzes worden beloond met een druppeltje milkshake. Deze beloning wordt voorafgegaan door een kort geluidssignaal. Een foute keuze wordt gevolgd door een geluidssignaal met een andere toon (frequentie) en het uitblijven van een beloning. De dieren voor deze studie zijn reeds gewend aan deze opstelling en verrichten de taak op vrijwillige basis goed en gemotiveerd uit.

Deze aapjes hebben in de voorgaande studie met DEC no. 1705 een teststof van [REDACTED] toegediend gekregen. Deze teststof was binnen [REDACTED] getest op toxiciteit en was binnen de dose range die is toegepast veilig. Verder betreft het een stof met een korte tijdelijke werking (zie DEC no 1705).

De planning van de studie 1705 was dat er drie verschillende stoffen toegediend zouden worden om geheugen bevorderende effecten te kunnen meten. Vanwege het uitblijven van effecten na de eerste teststof en vanwege reorganisaties binnen [REDACTED] waardoor de [REDACTED] tak verdween, is besloten de andere twee teststoffen niet meer te testen. Ik verwacht geen interacties door het eerder gebruik van de teststof met de nu voorgestelde studie.

#### Procedure:

De studie bestaat uit twee groepen van 5 dieren. De controle groep (groep 1) wordt normaal volgens de standaard binnen TNO gehuisvest de andere groep (groep 2) wordt voor een periode van twee weken individueel geïsoleerd van de andere dieren (zie bijlage 1 achterin). Halverwege de tweede week van de isolatieperiode worden de dieren uit groep 2 gedurende een kwartier in een ander territorium geplaatst. Hiervoor worden de controle dieren (groep 1) gebruikt. Hierna worden ze teruggeplaatst in de isolatiehuisvesting. Na de twee weken isolatie worden de dieren teruggebracht naar de normale verblijfsruimte waar ze naast de aap komen te staan waarbij ze eerder in het territorium zijn geweest.

Voor de isolatie periode worden bij alle dieren onder isofluraan/O<sub>2</sub> anesthesie en een lokale pijnbestrijding van lidocaine op de huid, twee EEG elektroden op de schedel geplaatst met 2 kleine chirurgische schroefjes gefixeerd met tandartsceement. Ook worden tegelijk twee EMG elektroden op de kinspier en de nekspier bevestigd voor het meten van de spierspanning. De EMG is van belang om REM-slaap van wakkerperiodes tijdens de slaap te kunnen onderscheiden. Deze EMG elektroden worden onder de huid door naar de andere twee EEG elektroden getunneld. Aan deze vier elektroden wordt een plugje bevestigd waarop tijdens de meting een transmitter kan worden 'geklikt' voor telemetrische meting van het EEG en EMG. Hierdoor kan de aap zich vrij bewegen zonder interactie van draden. De ontvanger voor het EEG en EMG signaal wordt onder de kooi bevestigd.

Twee weken na het aanbrengen van de elektroden zal van het EEG/EMG een basiswaarde worden opgenomen tijdens slaap en tijdens taakverrichting met de CANTAB in hun verblijfskooi. Van de andere parameters worden ook basis waarden verzameld. Deze bestaan uit:

- bloedmonster (20 ul) via de hielprik methode (~ bij mensen met de vingerprik) voor cortisol meting.
  - startle response: motor reactie van het dier op 20 geluidspulsjes (110 db, 10 KHz en een duur van 20 ms),
  - home cage activiteit welke automatisch 24 uur per dag wordt geregistreerd via bewegingsdetectoren
  - locomotor behavior in de bungalow test waarbij de aap gedurende 20 minuten zich vrij in deze opstelling kan verplaatsen (de activiteit wordt middels video tracking geregistreerd).
  - observaties (klinische symptomen en angst en depressie gerelateerde symptomen) Deze observaties vinden voor een deel plaats via een video camera waardoor de interactie met de mens voorkomen wordt.
- Voor uitleg gedragstesten en observaties zie bijlage 1 achterin.

Tijdens de isolatieperiode van 2 weken wordt geen gedrag of EEG gemeten. Wel worden de dieren gevolgd met behulp van de observaties. Alle metingen en registratie van gedrag etc vinden plaats op overeenkomende tijden bij alle dieren uit beide groepen. Na terugkomst in de normale huisvesting wordt wekelijks het gedrag en EEG gemeten (dus 1 maal per week). De observaties vinden dagelijks plaats met uitzondering van de weekends. En in de eerste week na terugplaatsing wordt een 2<sup>de</sup> bloedmonster (20 ul) afgenomen voor cortisolmeting.

Na 2 maanden worden de dieren geofferd voor histologisch onderzoek. Dit histologisch onderzoek zal worden uitgevoerd [REDACTED] die ervaring hebben met het meten van schade aan de hersenen als gevolg van stress. Voor decapitatie worden de aapjes met isofluraan/O<sub>2</sub> inhalatie narcose verdoofd.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

| Groep | BEHANDELING                                                                                                               | BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)                                                                                                                                                                                                                                      | AANTAL | SEXE          |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------|
| 1     | Normale huisvesting<br>Bezoek van een ander aapje in hun kooi voor een periode van 15 minuten                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aanbrengen EEG en EMG elektroden (onder isofluraan/O<sub>2</sub> anesthesie).</li> <li>Gedragsobservaties/metingen</li> <li>EEG/EMG registratie</li> <li>Hielprik voor bloedmonster 20 ul voor cortisol meting</li> </ul> | 5      | Man/<br>vrouw |
| 2     | Isolatie huisvesting voor een periode van 2 weken, Tijdens de tweede week een korte herplaatsing in een ander territorium | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aanbrengen EEG en EMG elektroden (onder isofluraan/O<sub>2</sub> anesthesie).</li> <li>Gedragsobservaties/metingen</li> <li>EEG/EMG registratie</li> <li>Hielprik voor bloedmonster 20 ul voor cortisol meting</li> </ul> | 5      | Man/<br>vrouw |

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol: Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandelingen deze dieren eventueel ondergaan

Om statistisch significante verschillen te kunnen toetsen zijn 5 tot 8 dieren nodig. Aangezien een tendens van de effecten al voldoende informatie zal bieden en we reeds ervaring hebben met het isolatie protocol wat leidt tot gedragsveranderingen ook na terugplaatsing (zie bijlage achterin) en het feit dat deze dieren al de CANTAB taak onder de knie hebben, is besloten om het minimaal noodzakelijk aantal dieren in te zetten van 5 dieren. Er zijn geen reserve dieren ingepland.

## PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Vanwege de translationele benadering en de te meten effecten op functionele gedragsaspecten is gekozen voor een diersoort verwant aan de mens. Onder punt 5 is dit ook belicht. Voor het testen van hogere cognitieve functies zijn primaten het aangewezen model. Voor de marmosetaap is reeds een gevalideerd systeem ontwikkeld (CANTAB, Cambridge, UK) waarmee deze functie te testen is. Verder bestaat er ook al ervaring binnen ons instituut met telemetrische EEG metingen binnen dit diersoort.

Welke sekse wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Dit onderzoek kan in principe met beide seksen uitgevoerd kunnen worden. Er zijn geen aanwijzingen dat de ene sekse gevoeliger is voor de ontwikkeling van PTSD dan de andere sekse. In deze studie is gekozen voor de overcomplete dieren (mannetjes en vrouwtjes) uit de studie met DEC 1705. Bovendien geeft de keuze voor beide geslachten een goede afspiegeling van de doelgroep populatie.

**13. Wat is de herkomst van de dieren:**

- ☐ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☒ overcomplete dieren uit de studie met DEC no 1705
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:
- ☐ anders, n.l.:

**14. Wat is het eindpunt van de dierproef:**

- ☒ euthanasie: Van alle dieren zal ex-vivo histologische metingen van de hersenen verricht worden
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

**15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?**

Vermeldt groepssamenstelling, kooitype, voedsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Gedurende de meeste tijd van de studie worden de marmosetapen individueel volgens de standaard richtlijnen in de gezamenlijke ruimte gehuisvest. Tijdens de PTSD inductie worden 5 dieren geïsoleerd gehuisvest gedurende twee weken. Daarna komen ze weer terug in hun normale situatie.

M.b.t. het houden cq. behandelen van de proefdieren bij TNO [REDACTED] wordt verwezen naar: WVS Q213-W-039, getiteld "Bestellen en huisvesten van proefdieren", waarin uitvoerig staat beschreven over doel, toepassing, uitvoering, werkwijze, ontvangst, uitgifte, huisvesting, gezondheidsbewaking, afvoer, kwaliteitsbewaking en WVS Q213-W-04, getiteld "Schoonmaken en onderhouden van de dierkamers", waarin uitvoerig staat omschreven over doel, werkkleding, schoonmaken, reinigingsmiddelen, voer, bedding, materialen, ruimte, gedragsregels, kwaliteitsbewaking en veiligheid, en WVS Q215-W-121, getiteld "Voorschriften en regels voor gedragsfaciliteit geb. 121", waarin hetzelfde voor de gedragsfaciliteit staat beschreven. Aangenomen wordt, dat de DEC bekend is met de hierboven genoemde werkvoorschriften en deze in haar bezit heeft.

**ONGERIEF****16. Beschrijf de aard van het ongerief:**

Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

De dieren zullen ongerief ondervinden aan de isolatie periode die als matig wordt gekarakteriseerd.

Het plaatsen in een vreemd territorium kan ook als matig ongerief worden ervaren.

Het terug plaatsen naast de aap waarbij men eerder in het territorium is geweest kan als gering/matig worden ervaren.

De startle reflex meting: gering/matig vanwege de korte schrikpulsen echter met een duur van 20 ms.

Aanbrengen elektroden onder inhalatie narcose: gering/matig (korter dan een dag).

Het registreren van het EEG en EMG verloopt telemetrisch waardoor geen ongerief wordt ervaren

De observaties en de niet invasieve gedragstesten worden als geen tot gering ingeschat.

Hielprik bloedmonster van 20 ul wordt als gering ervaren (2x).



**17. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):**

| Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief |                  | Duur van het ongerief |           |               |               |
|---------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|-----------|---------------|---------------|
|                                                                     |                  | < 1 dag               | 1-7 dagen | 7-30 dagen    | > 30 dagen    |
| Mate van ongerief                                                   | A: gering        |                       |           |               |               |
|                                                                     | B: gering/matig  |                       |           | Groep 1 (n=5) |               |
|                                                                     | C: matig         |                       |           |               | Groep 2 (n=5) |
|                                                                     | D: matig/ernstig |                       |           |               |               |
|                                                                     | E: ernstig       |                       |           |               |               |
|                                                                     | F: zeer ernstig  |                       |           |               |               |

Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.

**18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?**

**Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.**

N.v.t.: Er zal geen pijn aan deze studie worden ondervonden. Tijdens het aanbrengen van elektroden wordt naast de anesthesie een plaatselijke pijnbestrijder lidocaine op de huid aangebracht voor het maken van de incisie.

**19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, danwel voor N.V.T.**

**20. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop?**

Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.

Binnen deze studie zullen geen mogelijke complicaties verwacht worden. Desondanks wordt de gezondheidstoestand van de dieren, zoals bij alle marmosetapen in de kolonie, standaard in de gaten gehouden. Ook worden de dieren dagelijks geobserveerd op klinische symptomen waaronder eetlust, lichaamsgewicht en poetsen van de vacht. Mochten er te grote afwijkingen in gedrag of fysiologie waargenomen worden, zal er een veterinaire geraadpleegd worden voor adviezen ten behoeve van de gezondheid.

**ALTERNATIEVEN**

**21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning) bestaan voor deze dierproef?**

**Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven in dit geval niet bruikbaar zijn:**

Bij onderzoek waarbij gekeken wordt naar hersenfuncties is het noodzakelijk te werken met het intacte dier. Gezien de aard van het onderzoek (inductie van PTSD) is het niet mogelijk te werken met vrijwilligers. Voor de keuze van de diersoort verwijs ik ook naar punt 12.

**Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:**

22. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan:

☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]

☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED]), tel. [REDACTED]

☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)

☐ elders, n.l.:

☒ zo nee; waarom niet: Dit is meerdere malen eerder gedaan bij vergelijkbare experimenten (zie verder punt 21).

**ANDERE ASPEKTEN**

23. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang?

Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die U verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.

Geen andere aspecten zijn m.i. van belang voor de DEC-commissie. Wel wil ik verwijzen naar DEC no. 1705 voor informatie over de achtergrond van de gekozen dieren en naar DEC no. 1374 waarbij ook het isolatieprotocol is gehanteerd. Als bijlage heb ik over dit model een uitgebrachte shortpaper toegevoegd als bijlage (zie bijlage 1).

onderzoeker

[REDACTED]

[REDACTED]

datum:

2 juni 2006

Na behandeling:  
secretaris DEC

manager operations BU4

[REDACTED]

[REDACTED]

datum:

2 juni 2006

[REDACTED]

## Bijlage 1:

# An isolation protocol for testing anti-depressants and anxiolytics in the marmoset monkey

M.J. Jongsma<sup>1</sup>, R.A.P. Vanwersch<sup>1</sup>, S.A.M. van Vliet<sup>1,2</sup>, I.H.C.H.M. Philippens<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dept. Diagnosis and Therapy, TNO Defence, Security and Safety, Rijswijk, The Netherlands

<sup>2</sup> Dept. of Psychopharmacology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

### Abstract

An isolation protocol in a nonhuman primate has been developed in which a 'natural' expression of fear and depressive behavior is present. Separation from the social group is stressful for nonhuman primates, elevating anxiety- and depressive-like behaviors.

Different readout-systems were used resembling depressive-like behavior in human: observational recordings of anxiety- and depressive-like behavior, human threat test (HTT), startle reflex, body weight and activity.

In the new protocol animals are tested during normal housing, during two weeks of isolation, and after re-socialization. There was a correlation between the observational and quantitative parameters confirming the anxiety related behavior during the isolation. After replacing the animals in the colony, most parameters recovered. Only depressive-like behavior was still present.

### Keywords

Marmoset monkey, behavior, isolation, anxiety, depression.

### Introduction

Testing anti-depressants or anxiolytics remains dependent to a great extent on the use of proper animal models of anxiety and depression. An ideal model would be one reproducing all features of human anxiety and/or depression. Therefore, an isolation protocol in a nonhuman primate has been developed in which a 'natural' expression of fear and depressive-like behaviour is present.

Separation from the social group is stressful for nonhuman primates, elevating anxiety- and depressive-like behaviours. It seems that patients suffering from depression elevated cerebrospinal fluid corticotrophin-releasing factor (CRF). Infusion of intracerebroventricular CRF did not affect this typical anxiety and depressive-like behavior in the separated monkeys in contrast to the social housed monkeys, indicating the natural development of depressive-like behavior [4].

To test the behavioral effects of anxiety and depression in this animal model, different readout-systems were used resembling depressive-like behavior in human: observational recordings of anxiety-like behavior and depressive-like behavior, HTT, startle reflex, body weight, and activity. These tests and observations are performed during normal housing, during two weeks of isolation, and during normal housing after the separation.

### Materials and methods

#### Animals

Eight adult male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*), aged 2-4 years with body weights of 300-450 g were obtained from BPRC, The Netherlands. Normally the animals are housed together in one room. During the isolation period, they were kept in separate rooms. The ambient temperature was regulated at  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ . The relative humidity was  $>60\%$ . A 12-h light-dark cycle was maintained. Animal care is described in Standard Operating Procedures in agreement with the European Community guidelines. An independent committee on Animal Care and Use approved this study.

#### Behavioral observation

The used scoring list is designed to record in detail the occurrence symptoms correlated to central effects and the condition of the animal. The following symptoms were taken into account: 1) Lack of appetite, 2) inadequacy of grooming, 3) apathy (i.e. the responsiveness of the animal to its surroundings), 4) mobility, 5) stereotypy (any repetitive, patterned and rhythmic movement), 6) stypic behavior (idiosyncratic non-locomotive stereotyped actions), 7) passive (maintenance of a non-locomotive behavior with no simultaneously scoreable behaviors).

except for self-directed behaviors), 8) huddle (fetal-like self-enclosed position with head lower than shoulder level), 9) back of cage (location of the animal in the cage).

Some parameters were grouped in anxiety-like signs: stereotypy and stypic behavior, and in depressive-like signs: mobility, passive, apathy, and huddle. The rates of severity were coded from 0 to 4 (0: normal, 1: extreme normal, 2: mild, 3: moderate, 4: severe). Besides these items the bodyweight was registered.

### Human Threat Test

For the marmoset monkey the effects of human interaction can be used to detect the effects of anxiolytic drugs [1]. The responses to a human observer were observed over 2 min. During this time, the human observer stands in close proximity to the marmoset's home cage. The observer is the only human in the room to prevent distraction. The behavior was registered by video monitoring.

The following parameters were recorded: 1) time spent in front of the cage, 2) time spent in nest box, 3) number of forward jumps, 4) body postures: number of tail postures (i.e. genital presenting), scent making, arched pilo, 5) Fear postures: slit stares (flattening of the ear tufts and staring at the threat through eye lids reduced to slits), rearing, twisting.

### Spontaneous exploratory behavior

The levels of activity, alertness, and exploratory behavior play an important role in practically all measurements of animal behavior. To assess automatically and quantitatively the combined loco-motor and exploratory activity of the marmoset the so-called 'bungalow' task is used [5].

The apparatus consists of four horizontally placed non-transparent PVC boxes (23 x 23 x 23 cm) with a mesh-wire top, interconnected by photo-cell-guarded PVC tubes. Four lights are mounted on the closed ceiling of the apparatus. A curtain surrounds the whole apparatus to avoid distraction of the animal. The animals could freely move and change from one compartment to another during a 20-minute session.

A video tracking system (Ethovision, Noldus) was used to register the movements of each animal. The loco-motor activity is expressed as the number of compartment changes.

### Auditory startle reflex

In the auditory startle reflex the stretching movement of the legs is used to reflect the reaction of the animal on a startle signal [2]. Animals are exposed to 20 auditory startle pulses (120 dB, pink noise, 20 ms) while standing on a platform in a PVC cage. The startle response of 200 ms duration is measured by a transducer connected with the platform, registering the force exerted by the animal upon presentation of the stimulus. The area under the curve (AUC) and amplitude and of the startle response are registered and used to express the motor reaction of the startle reflex [6].

### Study design

Baseline values from all read-out systems were collected during normal housing. Thereafter, all eight animals were isolated in separate rooms to induce depressive-like behavior [5]. During two weeks of isolation the same parameters were checked, like the daily observational scoring and bodyweight, and the weekly Human threat test and Bungalow test. After these two weeks the animals were re-socialized in the common marmoset facility. For the period of one week the animals were re-tested.

### Methods for statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SEM. An ANOVA analysis was applied followed by a Newman-Keuls test where appropriate and a t-test with Welch's correction. In all tests p values < 0.05 were considered significant.

### Results

During isolation, most parameters were significantly affected (see Table 1, Fig. 1 and 2). There was a correlation between the different parameters (observational and quantitative parameters) confirming the anxiety related behavior.

After resocialization, most parameters recovered to normal. Only the depressive-like behavior was still present.

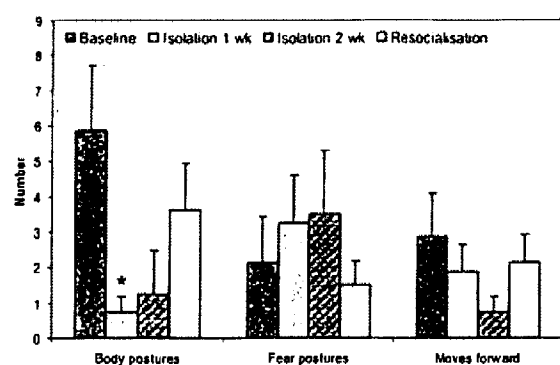


Figure 1. Human Threat Test: mean ( $\pm$  SEM,  $n=8$ /group)

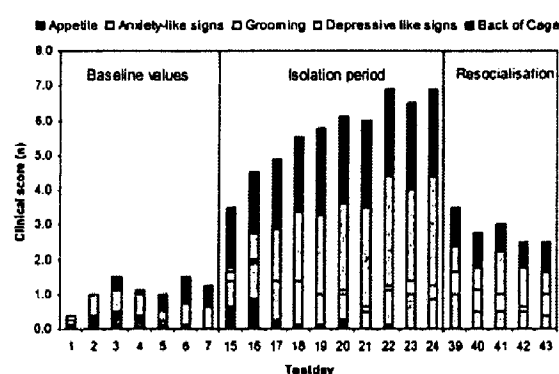


Figure 2. Observational parameters (mean,  $n=8$ /group)

|                 | Baseline | Isolation | Resocialization |
|-----------------|----------|-----------|-----------------|
|                 | e        | n         | n               |
| Startle reflex: | 3985     | 5277      | 4515            |
| AUC             | (587)    | (1030)    | (655)           |
| Startle reflex: | 3.3      | 4.3       | 3.0             |
| Amp             | (0.8)    | (1.4)     | (0.7)           |
| Time in nest    | 2.4      | 46.4      | 0.4             |
| box in sec      | (1.8)    | (21.6)    | (0.4)           |
| Time in front   | 46       | 19        | 72              |
| in sec          | (12)     | (2)       | (17)            |
| Body weight     | 371      | 357       | 369             |
| in g            | (1)      | (1)       | (1)             |
| Bungalow        | 68       | 38        | 56              |
| # shifts        | (26)     | (9)       | (22)            |

Table 1. Effects of isolation on startle reflex, HTT, body weight and activity (mean (SEM)  $n=8$ /group).

## Discussion

During isolation a significant increase of depressive-like and anxiety-like signs were found ( $p < 0.001$ ). These effects were found in all test systems used. The fear postures and the time spent in the nest boxes in the HTT increased, which is in accordance with the direction tendency on the startle response. Also the body weight decreased during isolation, although the activity -both in the home cage and in the bungalow task- decreased. Furthermore, the moves forward and time spent in the front of the cage both decreased as a result of the isolation. These parameters are correlated with anxiolytic behavior, indicating more fear.

Otherwise, the body postures almost disappeared in the HTT. Body postures are mainly territorial postures which are normal in the presence of other marmoset monkeys.

Remarkably, during resocialization, after the separation period, most parameters recovered to almost normal. Only depressive-like behavior was still present and grooming became more inadequate. Grooming is correlated to depressive-like behavior. CRF leads to excessive grooming behavior [4]. Indeed, after resocialization the CRF levels probably decreased in these animals, leading to rebound inadequate grooming effects.

In conclusion: The isolation protocol of these social animals, result in severe depressive and anxiety-like behavior. Therefore, this protocol can be used as a model for testing anti-depressants and anxiolytics in the marmoset.

#### References:

1. Carey, G.J.; Costall, B. (1992) Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacol Biochem. and Behav.*, **42**, 143-153
2. Davis, M.; (1992) Neurochemical modulation of Sensory-motor reactivity: Acoustic and tactile startle reflexes. *Neurosci. biobehav. rev.*, **4**, 241-263
3. Dunn, A.J.; Berridge, C.W. (1990) Physiological and behavioural responses to corticotropin releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.*, **15**, 71-100
4. Dunn, A.J.; Lai, C.W. (1987) CFR-induced excessive grooming behavior in rats and mice. *Peptides*, **8**, 841-844
5. Philippens, I.H.C.H.M.; Melchers, B.P.C. (2000b) Behavioral test systems in marmoset monkeys. *Behavior Res. Methods, Instruments, and Computers*, **32**, 173-179
6. Strome, E.M.; Wheler, G.H.T. (2002) Intracerebroventricular corticotrophin-releasing factor increases limbic glucose metabolism and has social context-dependent behavioral effects in nonhuman primates. *PNAS*, **99**, 15749-15754