

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

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

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

E-mail: [redacted] telefoon: [redacted] / fax: [redacted]

Kerngebied en locatie: Defensie en Veiligheid, Rijswijk

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. **titel:** Verfijning en ontwikkeling van gedragstesten voor de marmoset in het kader van onderzoek naar PTSD (post traumatic stress disorder)

1.2. **studienummer:** nog niet bekend

1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** [redacted]

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

E-mail adres onderzoeker: [redacted]; [redacted]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr: [redacted]

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD): [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]

Externe samenwerking (indien van toepassing): n.v.t

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: Februari 2009

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

Geplande duur van de onderzoeksplan: DEC-aanvraag is bedoeld voor onderzoek in 2009 en 2010

Locatie waar dieren worden gehouden: [redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie: Welke hiervan is pijnbestrijding?

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	33	1	15	32	1	1	01	01	1	4	3	3

RELEVANTIE

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

Hoe kunnen bestaande gedragstesten voor de marmoset geoptimaliseerd worden voor het detecteren van cognitieve en angst gerelateerde gedragsafwijkingen in marmosetten?

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

- 6.a.1 Gezondheid mens/dier
- 6.a.2 Economisch belang
- 6.a.3 Milieu belang
- 6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3

Militairen opereren vaak onder zware omstandigheden waarbij hij of zij met fysieke bedreigingen en met groot menselijk leed te maken kan krijgen. Uit internationaal onderzoek blijkt dat, naast de directe lichamelijke gevaren, het risico op het ontwikkelen van psychische problemen en stoornissen als gevolg van uitzending aanzienlijk is. De confrontatie met geweldsuitoefening, constante dreiging van aanslagen en gevaar voor eigen leven zijn factoren die bijdragen aan het mogelijk ontwikkelen van dergelijke problemen. Daarnaast zijn gijzeling, martelingen en lichamelijk letsel factoren die het risico verder verhogen. Posttraumatische stress stoornis (PTSS) is de belangrijkste psychische stoornis, die vaak gepaard gaat met diverse angststoornissen.

Het voornaamste symptoom bij de psychiatrische diagnose PTSS is dat de onaangename herinneringen zich blijven opdringen in de vorm van herbelevingen en nachtmerries. De slachtoffers ontwikkelen vaak een sterk vermijdingsgedrag: ze gaan alles uit de weg wat hen aan de traumatische ervaring kan herinneren. Enkele andere symptomen die kunnen optreden zijn: verhoogde prikkelbaarheid, concentratieproblemen, lusteloosheid, gevoelens van vervreemding, angstaanvallen, schrikachtigheid en slapeloosheid.

6.b Wetenschappelijk belang:

Om beter te kunnen begrijpen hoe PTSS en andere aan stress gerelateerde aandoeningen ontstaan, is het belangrijk om te beschikken over een goed diemodel, waarin gevoeligheid, voorspelbaarheid van en interventie bij stress-gerelateerde klachten bestudeerd kunnen worden. In de praktijk is het zo dat militairen tijdens uitzending voortdurend worden blootgesteld aan verschillende niveaus van stress. In deze groep mensen is het onderzoek naar stress-gerelateerde klachten alleen mogelijk door middel van retrospectief onderzoek, nadat de diagnose is gesteld. In diemodellen is het mogelijk prospectieve studies uit te zetten, waarin onderzocht kan worden welke vormen en/of combinaties van stress leiden tot blijvende veranderingen in de stress respons. Het doel van de voorgestelde studie is het valideren van testen ten behoeve van ontwikkeling van een stressmodel in de marmoset. Naast het feit dat de marmoset beschikt over hogere cognitieve functies dan de rat, heeft dit proefdier een meer op de mens gelijkend EEG-slaappatroon en hormonale respons v.w.b. de HPA-as (hypothalamus-pituitary-adrenal-axis). Door deze grotere gelijkenis, zijn de fysiologische- en gedragsmatige respons in deze diersoort naar verwachting beter extrapol eerbaar naar de mens. In een parallelle studie wordt een stressmodel opgezet in de rat, dat in een later stadium geextrapoleerd zal worden naar de marmoset. De basale mechanismen voor stress respons vinden hun oorsprong vinden in hersengebieden, die ook in de rat goed ontwikkeld zijn. De rattenstudie dient als voorbereiding voor een dergelijk stressmodel in de marmoset, waarin de hogere cognitie en het vergelijkbare slaappatroon een meerwaarde zullen vormen boven het rattenmodel. Bovendien brengt de uiteindelijke voorgenomen combinatie van een ratten- en marmosettenmodel een extra verstevigende stap in het translationele onderzoek naar stress-gerelateerde aandoeningen.

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?

Het betreft hier een onderzoeksprogramma () waarbij de Militair Geestelijke Gezondheidszorg/Centraal Militair Hospitaal (), Utrecht) de regie voert. Deze instantie heeft de wetenschappelijke/maatschappelijke relevantie van het voorgestelde onderzoek goedgekeurd. In de voorbereidingsfase hebben we (), geconsulteerd, wiens promotie-onderzoek aan stress gewijd was. TNO () is betrokken vanwege de relatie met het humane psychologische onderzoek aan stress dat daar wordt uitgevoerd. Verder (), Leiden geconsulteerd vanwege haar fundamentele stress-onderzoek met muizen. Met name het diemodel en het type biomarkers is met bovengenoemde groepen besproken. Eveneens hebben literatuurstudies m.b.t. diemodellen en relevante stress-biomarkers bijgedragen aan de opzet van het huidige onderzoeksvoorstel.

Zo nee, waarom niet?

PROEFOPZET

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

- ☒ nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☐ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.:
- ☐ 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?

Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz.

Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De testen binnen dit onderzoeksvoorstel hebben als doel het zo goed mogelijk leren karakteriseren van de individuele marmosets en het standaardiseren van nieuwe testen die zullen worden uitgevoerd in het kader van stress gerelateerd translationeel onderzoek. De methoden die worden beschreven in deze paragraaf zullen worden getest op hun uitvoerbaarheid en validiteit in de dieren. Per dier zal worden bijgehouden welke tests hij heeft ondergaan, zodat de maximale aantallen zoals beschreven in vraag 16 niet overschreden zullen worden. Daarnaast wordt hierbij in acht genomen, dat de dieren geschikt moeten blijven voor toekomstig gedragmatig onderzoek naar stress, ze zullen dus zo min mogelijk worden blootgesteld aan (extreme) stress.

Methoden:

Ontwerpen van een minder stressvolle manier om speeksel en urine te samplen bij de marmoset. Momenteel hebben wij geen ervaring in het samplen van speeksel en wordt urine gesampled in metabolisme kooitjes. Bij voorkeur samplen we nu beide substanties zonder inductie van extra stress.

De alternatieve methode die uitgetest zal worden is klikkertraining. Binnen ons lab zijn een aantal mensen met ervaring in deze techniek en we zullen kijken of we de dieren vanuit de thuiskooi en zonder uitvangen urine en speeksel kunnen afnemen door ze vrijwillig op een watje te laten kauwen of vrijwillig in een buisje te laten plassen. Daarop volgend zal er gekeken worden of de hoeveelheid substantie dan genoeg is om stress gerelateerde markers te meten.

Ontwerpen van een minder stressvolle manier om bloed te samplen bij de marmoset. Momenteel wordt een bloedsample genomen onder strakke fixatie of narcose di. Omdat beide manieren variabel zouden kunnen interfereren met de stress parameters die gemeten worden in het bloed.

De alternatieve methoden die zullen worden uitgetest zijn: 1) het verdoven van de aanprikplaats op de staart of lies (v femoralis) met EMLA creme; 2) de dieren wennen aan bloedsamplng dmv gedragstraining (klikker); 3) minder invasieve manier van fixeren, ipv met hand vanuit de koker; combinatie van 1,2 en/of 3. Op basis van cortisolmetingen, acute marker voor stress in het bloed, zal bepaald worden of er verschil is tussen de methoden, en of een bepaalde methode minder stressvol is dan een andere, waardoor uiteindelijk de meest optimale methode gekozen kan worden.

Ontwerpen en testen van gedragstesten om "persoonlijkheidskenmerken" (ook wel 'traits' genoemd) van de individuele dieren in kaart te kunnen brengen.

Spontaan exploratief gedrag in de Bungalow-opstelling + novelty challenge design. In deze opstelling wordt de spontane motorische activiteit getest en via camera vastgelegd en via videotracking . Het betreft een 4-compartimentsopstelling waarvan de compartimenten onderling verbonden zijn met plastic buizen, zodat de dieren van het ene naar het andere compartiment kunnen bewegen. Een video camera legt een aantal parameters, zoals beweegsnelheid, afgelegde weg, in welk compartiment geweest en hoe vaak, vast. Als modificatie, dienend als bv novel challenge zal de bungalow worden aangepast in een van de compartimenten, of bv door middel van achtergrondgeluid. De belasting voor de dieren zal hierdoor nauwelijks anders zijn dan een normale test in de bungalow. Een verandering wordt als effectieve novel challenge beschouwd als de respons door een aantal

dieren significant en gelijksoortig verandert (bv minder exploratie of juist meer, meer/minder vocaliseren; ander soort bewegingspatroon)

Reactie van het dier op handling zal worden gescoord. Door goede observatie van het dier na een test kan de bestaande lijst voor clinical score en human threat test worden verfijnd met additoele individuele kenmerken van de dieren mbt bv vocalisatie; activiteit, motorische beweging.

Reactie van het dier op uitvangen en terugplaatsing. Score als boven.

Leervermogen en motorische performance in Hand- Oog-Coördinatie-opstelling. In deze geautomatiseerde gedrags-opstelling wordt een marmoset individueel in een kooitje geplaatst. Het kooitje wordt voor een robotarm gehangen, die een reward voor de kooi beweegt. Het dier leert de reward te pakken bij toenemende snelheid. Naast motorische vaardigheid, is de test een maat voor de maat van attentie van het dier en licht cognitief.

Startle-respons test. In deze test wordt het dier in een koker op een druktransducer geplaatst. Het dier wordt blootgesteld aan 3*20 korte geluidspulsen van 100 dB. Serie 1 en 3 worden gedaan in het licht; terwijl serie 2 in het donker wordt uitgevoerd. De startle respons zal in deze situatie naar verwachting hoger zijn, en tijdens serie 3 in het licht weer snel normaliseren naar de uitgangswaarde zoals in serie 1.

CANTAB. Deze cognitieve test vindt plaats in de thuishooi en is daarmee niet invasief. Een apparaat met een touchscreen wordt voor de kooi gereden. Het dier moet leren om bepaalde vormen te herkennen en aan te raken in een bepaalde tijdsperiode. Tot nu toe is het gelukt om alleen een heel eenvoudige taak aan te leren. Het doel van deze studie is het verhogen van de gevoeligheid door de CANTAB taak moeilijker te maken, maar zodanig dat het voor de dieren wel te leren is. Mogelijk wordt in deze taak gebruik gemaakt van een licht aversieve stimulus bij een incorrecte respons in de vorm van smaak (bv beetje citroensap of kinine), in combinatie met een 'reward' in de vorm van siroop of bananenmilkshake. De haalbaarheid van deze aanpak zal getest worden.

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
7	Klikkertraining en optimale methode om bloed af te kunnen nemen (zo weinig mogelijk stress); <u>Personality-onderzoek</u> : Observatie home-cage gedrag, Bungalow-test, startle-reflex, Hand-Oog-Coördinatie; Vaststellen effectieve ' <u>novel challenge</u> ' test	Speeksel, Urine en bloedsampling Bloedsampling via v.femoralis onder plaatselijke verdoving met EMLA cream;	15 marmosetten	8 man, 7 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 studieplan:

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.

Marmoset-onderzoek:

Het is nog niet te zeggen hoeveel apen uiteindelijk nodig zullen zijn om steekhoudende statistische conclusies te kunnen trekken uit de stress-experimenten. Het hier ingeluide onderzoek betreft slechts een pilot waarin, zoals uiteengezet, vnl de 'personalities' van de dieren onderzocht zullen worden en geschikte uitleesparameters voor stress-sensitisatie, geëxtrapoleerd van uit ervaring in de mens en knaagdier.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8.

We hebben voor ogen de marmoset te gebruiken voor translationeel onderzoek in het kader van stress-gerelateerde aandoeningen zoals PTSD. Een van de belangrijkste aspecten in stress-gerelateerde aandoeningen is aantasting van de cognitie, hetgeen nog niet gemodelleerd kon worden in knaagdieren, in tegenstelling tot de gedragsmatige stress-respons. De marmoset beschikt over hogere cognitieve vaardigheden dan knaagdieren, waardoor dit specifieke aspect beter in beeld gebracht zou kunnen worden. Daarnaast komen de hormonale respons en het slaappatroon beter overeen met de humane situatie, waardoor het gebruik van deze species in stress-gerelateerd onderzoek naar verwachting van grote meerwaarde zal zijn.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

- ☒ aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- ☐ euthanasie ten behoeve van de proef
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☒ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

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

Marmoset:

De huisvesting van de marmosetten is bij voorkeur, en in lijn met de Europese richtlijnen in grote kooien in single sex paartjes. Dierv verzorging is zeer goed bekend met de dieren en er wordt dus ook veel tijd geïnvesteerd in het goed matchen van de verschillende dieren. Wanneer er geen sex genoot gematched kan worden binnen deze 15 marmosetten dan kijken we of we een aap in experiment kunnen matchen met een marmoset uit de voorraad. Wanneer dat niet lukt huisvesten we dit dier afhankelijk van het doel voor dit dier in de proef in overleg met Dierv verzorging alleen of met een niet sexgenoot (inc geboortebepanking).

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.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1	15 marmoset	Bungalow task	Max 3 maal per week	2
1	15 marmoset	CANTAB in thuiskooi	Max 5 maal per week	1
1	15 marmoset	Bloed sampling	Max 1 maal per 2 weken	3
1	15 marmoset	Hand-oog coordinatie	Max 5 maal per week	2
1	15 marmoset	Dark enhanced startle reflex	Max 2 maal per week	3
1	15 marmoset	Observation	Daily	0
1	15 marmoset	Novel challenge	Max 1 maal per 2 weken	2

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-effect.
Gebruik de codering:
Code 1: gering
Code 2: gering/matig
Code 3: matig
Code 4: matig/ernstig
Code 5: ernstig
Code 6: zeer ernstig
[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]
- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1	15	3

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

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

Plaatselijke verdoving bij de bloedafname. Verder zijn de technieken niet invasief en is geen sprake van additionele pijnstilling of anesthesie.

19. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Wanneer dieren afnemen in gewicht of anderszins tekenen van ziekte vertonen zal een dierenarts geraadpleegd worden.

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.

In dit experiment zijn geen complicaties voorzien, de technieken zijn doorgaans niet invasief, of er is voldoende ervaring met de toe te passen techniek.

ALTERNATIEVEN

21. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel in vivo als in vitro, bestaan voor deze dierproef?

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

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

Binnen deze dec willen we een aantal technieken uitproberen om verfijning te bewerkstelligen; diervriendelijke manieren van sampling en verfijning van onze gedragsuitleessystemen.

Tevens is deze DEC deel van een groter project waarin voor andere vraagstukken in rat en in vitro onderzoeksvragen beantwoord zullen worden.

Bestudering van het gedrag is niet te verwezenlijken in een niet-totaal organisme, we kiezen er dus voor om gedragsparameters in zowel de rat als marmoset te combineren om het aantal dierproeven te minimaliseren en het optimale model te kiezen voor iedere separate onderzoeksvraag.

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.: Externe deskundige op het gebied van stress onderzoek [REDACTED], [REDACTED]
- ☐ zo nee; waarom niet: Gezien de overweging onder 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.

Er zijn hier geen andere aspecten te noemen.

24. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

PTSD: Post traumatisch stress disorder
HPA-as: Hypothalamus-pituitary-adrenal-axis
CANTAB: Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery

[REDACTED]
(verantwoordelijk onderzoeker)

[REDACTED]
(BU4-Management)

Datum:

Datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker