

Datum ontvangst DEC: 9 maart 2011
19 april 2011 inclusief amendement I final

DEC nr: 3088

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:

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

Kerngebied en locatie: [redacted]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

- 1.1. **titel:** Onderzoek naar de individuele gevoeligheid voor de gevolgen van stress-sensitisatie bij ratten met een focus op glucocorticoid-receptoren op leucocyten.
- 1.2. **studienummer:** Nog niet bekend
- 1.3. **titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):** Optimale (na)Zorg Personele Inzetbaarheid (project Min Def)

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

E-mail adres onderzoeker: [redacted]

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

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

Externe samenwerking (indien van toepassing): [redacted]

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: April 2011

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

Geplande duur van het onderzoeksplan: DEC-aanvraag is bedoeld voor onderzoek in 2011.

Locatie waar dieren worden gehouden: [redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	02	1	18	32	1	1	01	11	1	1	4	1
2	1	02	1	18	32	1	1	01	11	1	1	3	1
Reserve	1	02	1	8	32	1	1	01	11	4	1	3/4	1

RELEVANTIE

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

Is er een verband tussen individuele gevoeligheid voor de gevolgen van stress-sensitisatie en het aantal glucocorticoid-receptoren op leucocyten bij ratten?

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**

Nadat militairen tijdens uitzend-operaties (Afghanistan, Irak) frequent zijn blootgesteld aan traumatische stress situaties, ontwikkelt een aantal van hen het post-traumatische stress syndroom (PTSS). PTSS is een ernstige psychische stoornis, die vaak gepaard gaat met diverse angststoornissen. Een belangrijk kenmerk is dat onaangename herinneringen aan meegemaakte trauma's 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. Omdat niet iedere militair deze symptomen ontwikkeld na een traumatische stress situatie, lijkt er een individuele gevoeligheid te zijn voor het ontstaan van traumagerelateerde symptomen en de ernst daarvan. Het verkrijgen van inzicht in het mechanisme achter deze gevoeligheid is een belangrijke vraag die centraal staat in deze studie en tot gerichte screening van militairen vóór uitzending kan leiden en daardoor kan bijdragen aan het nemen van de juiste maatregelen ter voorkoming van langdurige klachten na een traumatische ervaring.

6.b Wetenschappelijk belang:

In het CMH (Centraal Militair Hospitaal, Utrecht) worden militairen onderzocht, zowel vóór als na uitzending. Dit onderzoek is bekend onder de naam Prismo-studie. Bloedmonsters worden geanalyseerd op diverse parameters om vast te kunnen stellen of er verbanden te leggen zijn tussen bloedwaarden gemeten vóór uitzending en de latere ontwikkeling van PTSS. Uit recente resultaten blijkt dat er significant meer glucocorticoid-receptoren aanwezig zijn op leucocyten (witte bloedcellen) van militairen die later PTSS krijgen (Van Zuiden, Vermetten *et al* 2011, *Am J Psychiatry* 168, 89-96). Omdat in het verleden met het diemodel voor stress-sensitisatie is aangetoond dat individuele gedragsverschillen voorspellende waarde hebben voor de symptomen na een traumatische ervaring (Geerse *et al*, 2006, *Behav. Brain Res.*, 174:112-118 en Geerse *et al* *Behav. Brain Res.*, 175:9-17), is het wetenschappelijk gezien een interessante vraag het mechanisme hierachter verklaard kan worden door verschillen in de aanwezigheid van glucocorticoid-receptoren op leucocyten. Daarmee wordt inzicht verkregen in het biologische mechanisme achter de individuele gevoeligheid voor stress in ons diemodel voor stress-sensitisatie dat we de afgelopen 2 jaar hebben opgezet (DEC 2740/2891). De translationele waarde van het diemodel zou hierdoor sterk opgewaardeerd kunnen worden. Naast het feit dat het aantal glucocorticoid-receptoren op leucocyten een uitstekende biomarker zou kunnen zijn met voorspellende waarde voor het krijgen van stress-gerelateerde aandoeningen, kan in het diemodel verder onderzoek verricht worden naar het mechanisme dat ten grondslag ligt aan stress-gerelateerde aandoeningen. Kortom, de wetenschappelijk waarde van ons diemodel zou sterk toenemen als we kunnen aantonen dat, net zoals bij de militairen, de mate van stress-sensitisatie samenhangt met het aantal glucocorticoid-receptoren op leucocyten.

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 onderzoek binnen deze nieuwe DEC-aanvraag is onderdeel van een grootschalig 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, . TNO is betrokken vanwege de relatie met het humane psychologische onderzoek aan stress dat daar wordt uitgevoerd. Verder , geconsulteerd vanwege haar fundamentele stress-onderzoek met muizen.

Zo nee, waarom niet? nvt

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.

Na aankomst in het lab kunnen de ratten (Wistar, man) 1 week habitueren. Na habituatie worden de dieren individueel gehuisvest en zullen 4 dagen enkele malen per dag gehanteerd worden om daarmee vertrouwd te raken met de experimentator. Daarna zal een pre-screening van gedrag in het 'Open field' plaatsvinden (zie tijdslijn in onderstaande tabel + toelichting beneden). Op grond van hun activiteit in deze test worden de dieren verdeeld in zogenaamde 'high' en 'low active' animals. Daarna wordt onder isofluraan (4% inductie, 2-3% onderhoud) narcose een verblijfscanule in de v. jugularis geplaatst (zie details beneden). Na een operatieherstelperiode van 1 wk wordt bloed afgenomen (max 50 ul/rat) om de basiswaarden van het corticosteron-gehalte vast te stellen. Hierbij kan blijken dat er verschillen bestaan m.b.t. deze parameter tussen naïeve dieren onderling, hetgeen van belang kan zijn bij de latere ontwikkeling van stress-sensitisatie. Daarna zal stress-sensitisatie geïnduceerd worden volgens het footshock-protocol dat werd vastgesteld in het onderzoek onder DEC-2739 (zie details beneden). 14 dagen na toediening van footshocks, worden de dieren getest in een Novelty challenge (zie beneden) om vast te stellen of inderdaad stress-sensitisatie is opgetreden. Tijdens en na deze test zal een serie bloedsamples worden afgenomen t.b.v. cortisolbepaling; totaal 6 samples (25 ul, via de reeds aanwezige jugularis canule): op t=0 (start test), 5, 10, 20, 30, en 40 min.

Tijdslijn (dagen)	Handeling	Bloed sample	Footshock	Open field	Novelty challenge
Wk 1	Aankomst/habituatie				
Wk 2	4 dagen 'handelen'				
Wk 3	Pre-screening gedrag			x	
Wk 4	Canule v.jugularis + herstel (rest vd wk)				
Wk 5	Footshock/sham	x (1 dag vóór shock)	x		
Wk 7	Screening (14 dd na footshock)	2x			x
Wk8	Euthanasie				

Verblijfscanule in v. jugularis

Tijdens de isofluraannarcose zal de verblijfscanule in de v. jugularis geplaatst worden. Deze is gevuld met glycerol/heparine om bloedstolling te voorkomen en wordt getunneld onder de huid naar de schedel en daar gefixeerd met cement. Daarna 1 week recovery. De kwaliteit van de canule wordt 1 keer per week gecontroleerd.

Footshock-protocol

Lichte footshocks (minder dan bij schrikdraad) zullen worden toegediend. Voor het toedienen van de 'footshocks' wordt een box met een gridfloor gebruikt met gladde wanden, zodat de footshock onvermijdelijk (inescapable) wordt. In DEC-aanvraag-2739 werd vastgesteld dat 10 footshocks (stroomsterkte van 0.5 mA/ 6s met 20-210 s

intervals; totale sessie-duur :15 min) zorgen voor een reproduceerbaar stress-sensitiserend effect. Na toedienen van de footshocks worden de dieren terug in de kooi geplaatst.

Openfield test

Opm: hier dient het protocol van [REDACTED], zoals beschreven in zijn proefschrift, exact gevolgd te worden, zodat onze uitkomsten goed vergelijkbaar zijn met de zijne.

De Openfield is een gevoelige test voor het meten van spontaan motorische activiteit, mate van immobiliteit en angst. De bewegingen van een dier in de Open field (1x1 m, omgeven door 25 cm hoge wandjes) worden gevolgd door een TV video + PC waarmee de bewegingen gekwantificeerd kunnen worden (EthoVision^R, Noldus Information Technology BV, Wageningen, The Netherlands). De Open field is virtueel verdeeld in bepaalde gebieden waarbinnen het gedrag bekeken wordt. Een Open field sessie duurt 10 min. Om eventuele invloeden van het circadiaan ritme op de meetresultaat te voorkomen, zullen alle dieren 's morgens tussen 9.00 en 12.00 uur getest worden. In deze test kunnen na ranking op basis van bv totaal afgelegde weg, 'low activity' ratten onderscheiden worden van 'high activity' dieren, zodat er 2 groepen van ieder 9 dieren ontstaan.

Novelty challenge

Ratten worden getest in een "Nieuwe omgeving" met en zonder "White noise"(85 dB) op de achtergrond. De reactie van de dieren zowel tijdens de noise als tijdens de stilte daarna is een maat voor de sensitisatie voor stress (Geerse, 2006; Van Dijken, 1993). Het gedrag, dat door observatie van de dieren wordt gescoord is een geaccepteerde maat voor sensitisatie voor stress. In de praktijk wordt deze test als volgt uitgevoerd. De ratten worden in perspex kooi geplaatst (25x25x30 cm), gescheiden door zwarte platen als meerdere dieren tegelijkertijd getest worden. Gedurende 5 minuten worden de dieren blootgesteld aan 85 dB Noise, gevolgd door 5 minuten "stilte"(background noise ca 55 dB). Hierna wordt het gedrag van de dieren gescoord volgens vooraf vastgestelde criteria (Bewegen, stilzitten, aandacht, opstaan, poetsen etc). Ratten worden getest in een "Nieuwe omgeving" met en zonder "White noise" (85 dB) op de achtergrond. De reactie van de dieren zowel tijdens de noise als tijdens de stilte daarna is een maat voor de sensitiefste voor stress (Geerse, 2006; Van Dijken, 1993), die in grote mate voorspeld wordt door het gedrag in het open-veld (Geerse, 2006). Tijdens en na de Novelty test zal een bloedsample (max 500 ul/rat) worden afgenomen om de toename en daarop volgende afname van de corticosteron-spiegel te kunnen vaststellen.

Euthanasie: Euthanasie vindt plaats 4 weken na toediening vd footshocks dmv overdosis Nembutal i.p.v. dmv decapitatie. Bij euthanasie willen we naast de hersenen, ook 'dorsale root ganglia' (bepaling pijnreceptoren) , milt (leucocyten t.b.v. glucocorticoid-R bepaling), bijnieren, en totaal bloed isoleren (hartpunctie).

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

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
1 (bevat 2 subgroepen: 'low' en 'high' act.	Footshock (stress-inductie)	'Handling', Open field (1x), Isofluraannarcose, Canule v.jugularis, Bloedsamplng (6x), Footshocks, Novelty challenge (2x)	18 (2 x 9)	♂
2 (bevat 2 subgroepen: 'low' en 'high' act.	Controle (geen footshock)	'Handling', Open field (1x), Isofluraannarcose, Canule v.jugularis, Bloedsamplng (6x), Novelty challenge (2x), sham footshock	18 (2 x 9)	♂
Reserve	t.b.v. groep 1 en 2	Canule v. jugularis	8	♂

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.

De parameter die aangeeft of het stress model valide is voor stress sensitisatie is de parameters “immobility” tijdens de novel challenge. Een verschil van 60 seconden in een testperiode van 5 minuten (300 seconden) wordt beschouwd als relevant effect. De standaarddeviatie is ca 40%. Om met een power van 80% een relevant verschil te kunnen meten van 60 seconden per dier, zijn groepen van minstens 8 dieren nodig (Geerse *et al* 2006). Omdat de standaardafwijkingen in de gedragsresultaten vrij groot waren in het voorafgaande onderzoek waarin het model werd opgezet (DEC-2739), willen we 2 hoofdgroepen van elk 18 dieren gebruiken in deze nieuwe DEC-aanvraag. Tijdens het vorige onderzoek bleek nl dat er in de prescreening test (Open field test), een onderscheid valt te maken tussen ‘low’ en ‘high’ actieve ratten; deze onderverdeling is interessant omdat ook deze observatie kan samenhangen met het gehalte GR-receptoren. Als we deze onderverdeling nu weer aanbrengen, hebben we dus te maken met 4 subgroepen van elk 9 dieren (controle ‘low active’, controle ‘high active’, footshock ‘low active, footshock ‘high active’.

Uit ervaring weten we dat ca 20% van de v.jugularis verstopt kan raken. Daarvoor worden voor dit protocol 8 reservedieren opgevoerd.

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.

De rat zal worden gebruikt omdat hersengebieden die de stressrespons aansturen zijn ook in knaagdieren goed zijn ontwikkeld. Dit betekent dat knaagdieren ook geschikt zijn voor het onderzoeken van de basale stress respons. Daarnaast bestaat voor deze species een goed beschreven stress model (o.a. Geerse *et al* 2006). Om de invloeden van de hormonale cyclus uit te sluiten is gekozen voor alleen mannelijke dieren.

13. Wat is de herkomst van de dieren:

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

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

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

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

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

Dieren worden na aankomst individueel gehuisvest in type 3 kooien met verhoogde draaddeksels zodat het dier rechtop kan staan (volgens de nieuwe richtlijnen). De dieren worden ad libitum gevoerd en tweemaal per week voorzien van vers drinkwater.

Voor zover nog van kracht i.v.m. de herijking van de richtlijnen, worden de dieren behandeld vlg de SOPs zoals die bij TNO [REDACTED] in gebruik zijn met betrekking tot “Bestellen en huisvesten van proefdieren” en “Schoonmaken en onderhouden van de dierkamers”.

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 en 2	36	Isofluraannarcose/ plaatsing canule v.jugularis	1x	2
1	18	Footshock	1x	4
1 en 2	36	Open field	1x	2
1 en 2	36	Novelty challenge	2 x	2
1 en 2	36	Individuele huisvesting	7 wk	3

Toelichting:

- Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 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).
- 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.]
- 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	18	4
2	18	3
reserve	8	3/4

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

Post-operatieve (na plaatsing canule in v.jugularis) pijnbestrijding met carprofen om samenhangende stress in te perken.

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

Dieren die ziekteverschijnselen vertonen, hetgeen tot uiting komt in gewichtsafname van >20% na 1 week, zullen de proef gehaald worden en geëuthanaseerd. Wanneer de canule losraakt van de schedel wordt het dier ook uit de proef genomen.

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.

Bijkomende risico's anders dan reeds genoemd onder punt 19, worden niet verwacht.

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:

Bestudering van het verschijnsel stress en stress-sensitisatie met daaraan gekoppeld o.a. psychosomatische/neuro-endocrine invloeden, is niet te verwezenlijken aan een niet-totaal organisme. De reservedieren worden pas dan in de proef meegenomen als er uitval heeft plaatsgevonden.

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])
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- ☒ 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:**

PTSS: post-traumatisch stress syndroom/stoornis

GR: glucocorticoid receptor

[REDACTED]

Datum:

Datum:

[REDACTED]

Datum:

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