

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie**DECNR: 2011-162****Ontvangen: 09-02-2012**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
27-02-2012	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	5	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	---	----------	--	--	--

Financieel
beheerder

Budgetnummer 30973626B

Titel van het onderzoek: **Effecten van centrale toediening van een TrkB agonist op lange-termijn geheugen bij ratten**startdatum **December 2011**einddatum⁹ **December 2015**Duur van de proef¹⁰: 4 mnd

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegd- heid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. Verantwoorde- lijk medewerker (VM) GGO ⁷					
4. overige uitvoerenden				Art. 9 Art 12 Art 9	
5.				Art.9/12 ⁸ Anders ⁶ :	

Diergroep	1						
ctrl/exp/sham	Exp						
Diersoort	02						
Stam	Wistar						
Construct / mutatie ?	Nee						
Herkomst (leverancier) *	02						
Aantal	30						
Geslacht	Man						
Dieren immuuncompetent ?	ja						
Leeftijd/gewicht	10w						
Doel van de proef *	32						
Belang van de proef *	01						
Toxicologisch onderzoek *	01						
Bijzondere technieken *	01						
Anesthesie *	04						
Pijnbestrijding *	04						
Mate ongerief *	04						
Toestand dier einde exp*	01						

* VHI-coderingen zie bijlage

¹ Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM
nov.'05)

(kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag.

Titel: Effecten van perifere toediening van een TrkB agonist op lange-termijn geheugen bij ratten.

1. Doel van de proef.

In het voorgestelde project willen we de effecten van een testsubstantie, 7,8-Dihydroxyflavone, onderzoeken in een object herkenning taak bij jong-volwassen ratten. BDNF en de belangrijkste receptor van BDNF, TrkB, worden tegenwoordig aanzien als een interessant target in de ontwikkeling van medicatie voor o.a. cognitieve dysfuncties zoals Alzheimers dementie. Bovendien zijn de cellulaire mechanismen die aan grondslag liggen van niet-pathologisch leren niet volledig doorgrond; de precieze rol en werking van BDNF zijn niet gekend. Wij willen de eerste selectieve TrkB agonist, 7,8-Dihydroxyflavone, toetsen in een geheugentaak in ratten, om de effecten ervan op geheugen te evalueren en zo een duidelijker beeld krijgen van het belang van BDNF in geheugenvorming. We willen bovendien meer te weten komen over welke moleculaire processen essentieel zijn in de effecten van BDNF-gemedieerde geheugenverbetering. Anderzijds zullen we met deze studie de mogelijke klinische relevantie van TrkB agonisten beter kunnen inschatten.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Dit project heeft een wetenschappelijk karakter. Deze studie is waardevol voor het begrijpen van de cellulaire processen onderliggend aan geheugen. Deze informatie is van grote waarde zijn in het onderzoek naar de neurobiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan leren en geheugen. Tevens is deze studie maatschappelijk relevant, aangezien het vergrootte inzicht in deze mechanismen mogelijk kan leiden tot de ontwikkeling van medicatie die de ouderdomsgerelateerde cognitieve dysfuncties en in het bijzonder dementie (bijvoorbeeld Alzheimers dementie) kan verbeteren of de achteruitgang van deze functies kan tegengaan.

3. Alternatieven

De voorgestelde studie kan niet bij mensen worden uitgevoerd omdat deze technieken (in het bijzonder de herhaaldelijke hippocampale toediening van substanties) niet bij mensen kunnen worden toegepast. Verder zijn er tot op heden geen andere testmethoden voorhanden die op voorhand de mogelijke cognitieve werking van substanties kan voorspellen op grond van, bijvoorbeeld, *in vitro* technieken. Dit type onderzoek is vooralsnog de enige methode om de mogelijke werking van substanties op geheugenfuncties te onderzoeken. Er worden ratten gebruikt omdat dit een vergelijk mogelijk maakt met eerdere studies die uitgevoerd zijn met substanties met een vergelijkbaar werkingsmechanisme (op basis van eerdere studies).

4. Ethische afweging

Gezien het grote maatschappelijke belang van het begrijpen van normale en pathologische geheugenvorming, en het gebrek aan alternatieven die ons vergelijkbare inzichten kunnen geven, zijn wij van mening dat het voorgestelde experiment opweegt tegen het gebruik van de dieren zoals beschreven in deze aanvraag.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Eén van de meest prominente aspecten van de ziekte van Alzheimer is de achteruitgang in cognitieve vaardigheden en in het bijzonder geheugenfuncties. Deze achteruitgang heeft grote negatieve consequenties voor de patiënt zelf maar zeker ook voor zijn/haar directe omgeving. Ondanks dat deze cognitieve problematiek slechts een onderdeel is van dit complex ziektebeeld, kan worden gesteld dat een verbetering van deze cognitieve functies bij Alzheimerpatiënten tot een betere levenskwaliteit zou leiden. Voor de behandeling van cognitieve stoornissen zijn op dit moment verschillende cholinesterase remmers (en recentelijk een partiele NMDA antagonist, memantine) op de markt verschenen (Bartus et al, 1982; Lleo, 2006; Hansen et al. 2008). Echter, deze behandeling heeft een relatief klein effect op geheugen in verhouding met de eerder ernstige bijwerkingen.

Uit ander onderzoek blijkt bovendien dat het werkingsmechanisme van cholinesterase remmer, i.e. verhogen van beschikbare acetylcholine, niet de beste manier zou zijn om geheugenfuncties te verbeteren (Lleo, 2006). Momenteel wordt er dan ook veel onderzoek verricht naar het identificeren van neurotransmitters of andere stoffen die van belang zijn voor het opslaan van herinneringen.

In vorige studies hebben we d.m.v. het toedienen van phosphodiesterase (PDE) remmers het belang van cAMP- en cGMP-gemedieerde cascades in de hippocampus voor de vorming van lange-termijn geheugen aangetoond (DEC 2007-112). Een belangrijk gevolg van deze moleculaire cascades is de aanmaak van nieuwe proteïnen, waaronder brain derived neurotrophic factor (BDNF). Als neuronale groeifactor is BDNF betrokken in neuronale overleving, groei en plasticiteit. Er zijn sterke indicaties dat BDNF en de binding van BDNF op de tyrosine receptor kinase B (TrkB), een belangrijke rol spelen in hippocampale consolidatie van het geheugen. Recent werd 7,8-Dihydroxyflavone geïdentificeerd als eerste selectieve agonist van TrkB (Jang et al., 2010). Met deze stof kunnen we dus activiteit van BDNF simuleren. We hebben in een vorig experiment (DEC 2010-195) kunnen aantonen dat centrale toediening van 7,8-DHF leidt tot een verbeterde geheugenconsolidatie in vroege en late fases van het leerproces. Om te ontdekken welke de belangrijkste processen zijn die TrkB fosforylatie activeert om geheugenvorming te verbeteren en de effectiviteit van systemische 7,8-DHF behandeling te evalueren, willen we perifere toediening van 7,8-DHF combineren met remmers van mogelijke "downstream-targets". Specifiek zijn we geïnteresseerd in de rol van PKA en proteïne synthese. De remmers voor deze processen kunnen enkel centraal toegediend worden, gezien er non-specifieke effecten zouden optreden en onze interesse bij het begrijpen van hippocampale geheugenprocessen ligt.

We hopen dat deze studie enerzijds beter inzicht zal geven in de hippocampale processen die ten grondslag liggen aan geheugen en meer specifiek duidelijkheid zal verschaffen in de onderliggende werkingsmechanismen van BDNF in de hippocampus. Anderzijds is het aangetoond dat BDNF een positief effect heeft op Alzheimer pathologie (Nagahara et al., 2010). 7,8-DHF is in dat opzicht een mogelijke nieuwe behandelingsmogelijkheid, in het bijzonder gezien het gunstige farmacokinetische profiel dat systemische (orale) behandeling mogelijk zou maken.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Deze studie is een onderdeel van een PhD project. Dit protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de PI.

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In deze studie zal gebruik gemaakt worden van 3 maanden oude mannelijke Wistar ratten (Charles River). We kiezen voor de 3 maanden oude Wistar ratten omdat deze ook in onze voorgaande experimenten werden gebruikt. We willen dan ook de vergelijkbaarheid van deze studie en vorige experimenten met farmacologische substanties om het lange termijn geheugen te onderzoeken (DEC 2010-195), optimaal houden. We hebben eerder ervaring opgedaan met stamverschillen in de object herkenning taak (Lewis ratten doen dit bijvoorbeeld heel wisselvallig).

7b. Sexe

We willen gebruik maken van mannelijke ratten aangezien we dit ook in de eerdere projecten hebben gedaan waardoor we weten welke condities gekozen dienen te worden voor het testen van het geheugen. De prestatie van vrouwtjes ratten is in de taak afhankelijk van de cyclus en daarom is deze taak minder geschikt om zowel mannelijke en vrouwelijke, of enkel vrouwelijke ratten te gebruiken. Bovendien kennen we de prestatie van deze dieren (4 maanden oude mannelijk Wistar ratten) in deze taak. Daarmee is een vergelijking met eerdere studies mogelijk.

7c. Aantallen

We willen onderzoeken wat de het effect is van farmacologische manipulaties in de hippocampus in de ORT test. Daarom gebruiken we dieren die canules in de hippocampus krijgen.

We veronderstellen een verschil in gemiddelde van 0.25 en een spreiding van 0.3 te vinden. Deze gegevens baseren we op data van vergelijkbare studies (dieren met canules in ORT). **Het betreft een within design waarin alle dieren elke conditie ondergaan.**

De poweranalyse (power 80%) toont in dit geval het volgende: $n = 15.7 * (0.3/0.25)^2 = 23$.

We moeten daarenboven rekening houden met een aantal uitvalfactoren. Een eerste factor is het exploratie gedrag. In vorige studies bleek dat een klein aantal van de dieren onvoldoende exploratie vertoonden in de ORT en daardoor uit het experiment moesten genomen worden. **In praktijk wil dit zeggen dat dieren die consequent minder dan 7 seconden exploreren in de ORT niet gebruikt kunnen worden.**

De plaatsing van canules is een andere risicofactor voor uitval gedurende het experiment. Canules kunnen verstopt of geïnfecteerd raken, en verkeerd geplaatst zijn (e.g. niet in de hippocampus). Ook deze dieren kunnen niet verder deelnemen aan het experiment. We trachten deze uitval te reduceren door de operaties zo accuraat en aseptisch mogelijk te verrichten. **Het niet meer kunnen injecteren van een dier omwille van een verstopping of pijn rondom de canule (infectie) zullen in dit geval redenen zijn om het dier uit experiment te halen**

Uit ervaring met vergelijkbare experimenten weten we dat we om een groep van 23 ratten te bekomen rekening moeten houden met een uitval. Het totale aantal ratten dat nodig is voor deze studie rekening houdend met de power-analyse én met de mogelijke uitval door exploratie of canuleplaatsing is 30. We hebben namelijk in het verleden ervaren dat ongeveer 4 dieren ($\pm 12,5\%$) ten gevolge van canule plaatsing, en ongeveer 3 dieren ($\pm 10\%$) door verminderde exploratie.

4 Dierproef

8. Experiment

Praktische uitvoering van proef

In de object herkenningstaak (ORT) worden de ratten 3 min in een cirkelvormige arena (doorsnede 83 cm en 40 cm hoog) gezet waarin twee identieke objecten staan. Een rat kan dan vrij exploreren en zal een gedeelte van de tijd aan de objecten snuffelen/exploreren. Het gedrag, i.e., de duur van contact aan de afzonderlijke voorwerpen, wordt door een geoefend persoon gescoord en opgeslagen op een PC. Als de dieren 1 uur later in dezelfde arena worden gezet met twee objecten waarvan 1 nieuw is en het andere hetzelfde object dat in de eerste 3 min ook aanwezig was, zal een rat meer tijd aan het nieuwe object snuffelen. Als echter 6 of 24 uur verstrijkt tussen de twee testfasen, zal een dier in de tweede testfase minder goed (na 6 uur) of niet (na 24 uur) discrimineren tussen het bekende en onbekende object. Het wordt aangenomen dat dit te maken heeft met het geheugen (object herkenning/geheugen): Na 24 uur is een rat vergeten welk object in de eerste testfase aanwezig was. Dit gedrag is vrij stabiel en kan herhaaldelijk getest worden.

In dit experiment zullen we een interval van 24 uur aanhouden tussen de testfasen in de ORT, om de processen onderliggend aan lange-termijn geheugen te onderzoeken.

Na twee weken van training in de ORT zal onder volledige narcose (volgens SOP, maar afwijkingen zijn mogelijk afgaande op de geobserveerde diepte van de anesthesie) met behulp van een stereotactische operatie de canules worden geïmplant. Voor de praktische en algemene handelingen gedurende de stereotactische procedure verwijzen we naar de bijgevoegde SOP-PSY01.

Na minstens een week revalidatie zal 7,8-DHF worden toegediend in de hippocampus en de effecten op het geheugen worden onderzocht.

De volgende condities zullen in eerste instantie onderzocht worden:

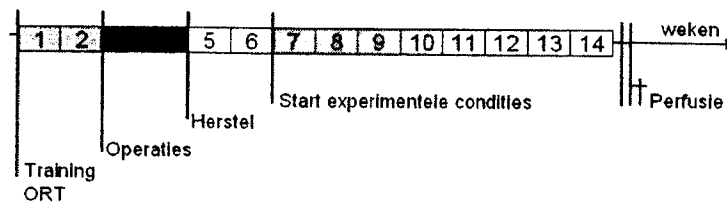
Controle conditie	<i>moment injectie</i>	Experimentele conditie	<i>moment injectie</i>
Vehicle (0,5% tylose; 4% tweek)	0h na eerste testfase	TrkB agonist (7,8-DHF; 1 en 3 mg/kg)	0h
	3h		3h
	6h		6h

Indien we geheugenverbetering observeren in één of meerdere van bovenvermelde experimentele condities, zullen we op dat tijdstip de behandeling in een suboptimale dosis combineren met een PKA remmer (Rp-8-Br-cAMPS 1 µg/hippocampus) en/of een proteïne synthese remmer (anisomycin 80 µg/hippocampus). Ook de bijhorende vehicle condities (saline) zullen in dat geval worden getest. Doseringen van de toegediende stoffen zijn gebaseerd op eerdere studies binnen onze groep of op relevante en vergelijkbare rapporteringen in wetenschappelijke literatuur.

Alle experimenten worden blind uitgevoerd, d.w.z. de gedragsonderzoeker zal blind zijn voor de te onderzoeken testcondities.

Na het experiment zullen we de dieren perfunderen met PBS. Eén helft van het brein zal worden nagefixeerd om de morfologie te bestuderen. De andere helft van het brein wordt gebruikt voor biochemische bepalingen.

De onderstaande figuur geeft een indicatie van het tijdsverloop van het experiment in weken. Vanzelfsprekend geldt deze tijdslijn voor beide groepen dieren.



9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie zal tijdens de stereotactische operatie worden aangewend zoals in het bijgevoegde SOP beschreven is.

9b. Pijnbestrijding

Zoals in de bijgevoegde SOP beschreven is, zullen de dieren een half uur voor de operatie met Temgesic (0.05 mg/kg) worden behandeld. De eerste twee dagen na de operatie zal het welzijn van de dieren regelmatig ge-evalueerd worden, en indien nodig zal de behandeling met Temgesic herhaald worden (0.01-0.05 mg/kg om de 8-12 uur).

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Euthanasie:

De dieren worden aan het einde van de proef in een diepe narcose gebracht met pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) en daarna perfundeerd met PBS.

Humane eindpunten:

In de vele eerdere experimenten die we gedaan hebben is nooit iets voorgevallen. Het kan dat dieren vanwege de operatie (infectie canule), de herhaalde injecties of andere redenen ziek worden. Gedurende het gehele experiment zal een ongerief dagboek bijgehouden worden. Als er buitengewoon zwaar of onverwacht ongerief optreedt, zal in samenspraak met de dierenarts (artikel 14) bepaald worden of additionele pijnbestrijding dan wel euthanasie gewenst is. Wanneer een dier niet meer kan worden getest in de ORT (bijvoorbeeld ten gevolge van de operatie of verstopping van de canule) zal het dier worden ge-euthanaseerd middels decapitatie.

10a. Ongerief



De operatie en het ondergaan van algehele narcose dient als matig/ernstig ongerief (code 4) te worden ingeschat. Dit zal vooral na de operatie zijn (1 a 2 dagen). De verdere handelingen (i.e. perifere injecties (oraal), centrale injecties en eenmalige i.p. injectie alvorens het doden van de dieren middels perfusie aan het einde van de proef), worden voor het dier als matig ongerief (code 3) beoordeeld. De toegediende stoffen hebben geen irriterende werking en hebben geen invloed op het welbevinden van het dier. Dit is ook niet wenselijk omdat anders de dieren niet getest kunnen worden in de gedragsopstelling. Het individueel huisvesten van dieren dient als matig/ernstig (code 4) ongerief ingeschat te worden aangezien ratten sociale dieren zijn.

Voor beide groepen geldt dan ook:

	Aard	Ernst	Duur/ Frequentie
Individueel huisvesten	Sociale deprivatie	Matig/ernstig	Gedurende het volledige experiment
Operatie onder narcose	Stress / pijn	Matig/ernstig	Éénmalig, eerste dagen na operatie
Injecties (centr/perifeer)	Fixatie / pijn	Matig	2 x per week tijdens de training (enkel perifeer) en de experimentele condities. Eenmalige i.p. injectie voor perfusie

Totaal ongerief voor beide groepen = matig tot ernstig

10b. Welzijnsevaluatie

Dit soort studies zijn veelvuldig uitgevoerd en we hebben niet de indruk dat de dieren veel ongerief hebben tijdens het testen en het toedienen van de farmaca bij de dieren. Tijdens deze studie zal zoals altijd het welzijnsdagboek bijgehouden worden.

11. Verzorging en huisvesting

Alle ratten zullen individueel gehuisvest worden totdat het experiment is afgerond. De ratten zullen op een omgekeerd dag/nacht cyclus gehouden worden. In een controle studie hebben we aangetoond dat sociaal gehuisde ratten slechter presteerden in de ORT dan individueel gehuisveste dieren (DEC 2006-138). Vandaar dat we zoals gebruikelijk bij deze studies opteren voor individuele huisvesting. We kiezen de dieren normaal voer te geven, ondanks de variabele inhoud aan flavonoides. We hebben een vehicle conditie die controleert voor deze factor, en we willen zoveel mogelijk testomstandigheden standardiseren om de vergelijkbaarheid met vorige studies in onze groep optimaal te houden.

12. Deskundigheid

Onze groep heeft veel ervaring met de procedures zoals beschreven in dit protocol.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Zie bijgevoegde SOP voor anesthesie en stereotactische plaatsing van canules.

Relevante literatuur

- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-417.
- Blokland, A. (1995). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews*, 21, 285-300.
- Buccafusco, J. J., Letchworth, S. R., Bencherif, M., & Lippiello, P. M. (2005). Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends in Pharmacological Science*, 26, 352-360.
- Choi, D. C., Maguschak, K. A., Ye, K., Jang, S., Myers, K. M., and Ressler, K. J. (2010) Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear *PNAS*, 107, 2675-2680.
- Hagan, J. J., & Morris, R. G. M. (1988). The cholinergic hypothesis of memory: a review of animal experiments. In L. L. Iversen, S. D. Iversen & S. H. Snyder (Eds.), *Handbook of psychopharmacology* (Vol. 20, pp. 237-305). New York: Plenum Press.
- Hansen, R.A., Gartlehner G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G., and Jonas D. E. (2008) Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*, 3(2): 211-225.
- Jang S., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y., Wilson, D., Xiao, G., Bianchi, B., Sun, Y. E. and Ye, K. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *PNAS*, 107, 2687-2692.
- Lleo, A., Greenberg, S.M. and Growdon, J. H. (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Ann Rev Med*, 57, 513-533.
- Nagahara, A. H., Merrill D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J. M., Rockenstein, E., Chao, M.V., Koo, E. H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A. A. and Tuszynski, M. H. (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 15(3):331-7.
- Reneerkens, O., Rutten, K., Steinbusch, H., Blokland, A., Prickaerts, J. (2008) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berl)*, DOI 10.1007/s00213-008-1273-x
- Rutten K, Prickaerts J, Hendrix M, van der Staay FJ, Sik A, Blokland A (2007) Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: Studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 558: 107-112

Bijlage I: Standard Operation Procedures (SOP)

Standard Operating Procedure:

Stereotactische operatie

Nummer: SOP-PSY01

Versie: 14

Datum: 15 november 2010

Auteur: .

Inleiding

Indien een onderzoeksvraagstelling verlangt dat een gedefinieerde kern in de muizenhersenen chemisch, biologisch (DNA plasmide) of farmacologisch wordt geprikkeld, of dat er een afleiding van hersenpotentialen wordt gemeten, kan dit worden gedaan met behulp van stereotactische procedures. De muishersenen zijn in kaart gebracht (e.g., Paxinos & Franklin, The mouse brain in stereotaxic coordinates, 1997). Nadat de kop van de **muis/rat** in de gewenste positie in de stereotacter is gebracht, biedt het coördinatenstelsel van de hersenatlas de mogelijkheid de exacte positie van de verschillende gebieden te bepalen. De positiebepaling van de hersengebieden kan gedaan worden vanuit drie referentiepunten, i.e., het bregma, het lambda, of de interauraal lijn. Deze referentiepunten kunnen alleen gebruikt worden indien de **muis/rat** tijdens de operatie gefixeerd is, en de positie van de manipulatorarm (met daaraan vastgemonteerd een, ijknaald, spuit, electrode, of canule) en het referentiepunt ten opzichte van elkaar hetzelfde blijft. De manipulatorarm is aan het fixatie gedeelte verbonden, en het totale apparaat wordt een stereotacter ('stereotactic frame') genoemd.

Deze methode kan ook gebruikt worden voor het plaatsen van elektrodes, waarmee de hersenactiviteit gemeten kan worden.

De mate van ongerief is 4.

Anaesthesie en analgesie bij operatie

De verwachting is dat de proefdieren minimaal zullen lijden als gevolg van de stereotactische operatie. Om toch een mogelijke pijncomponent te bestrijden zullen de dieren voor de operatie, evenals 8 uur na de operatie, een injectie krijgen met Temgesic (muis 0.1 mg/kg, rat 0.05 mg/kg, s.c.). De stereotactische operatie wordt onder algehele narcose uitgevoerd. Om de muis/rat onder narcose te krijgen wordt ze in een inductie kastje gezet met een gasmengsel van lucht en isofluraan (4%). Als de muis/rat onder narcose is, wordt een narcose masker aangebracht om de narcose te onderhouden met het gasmengsel (2,5% isofluraan). Voordat de muis/rat in de stereotacter gefixeerd wordt, dient de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen te zijn. Narcose wordt ook in de stereotacter onderhouden via het narcose masker. De ogen zullen met oogzalf worden behandeld om zodanig uitdroging te voorkomen. Ook zal gekeken worden of de ademhaling diep en regelmatig is (ook na toediening van matige pijnprikkel. Aangezien het periost wordt verwijderd op de schedel, zal tevens lokaal lidocaine op de wond worden toegediend. Vlak voor de operatie zullen de dieren een injectie

krijgen met Temgesic (muis: 0,1 mg/kg, rat: 0.05 mg/kg, s.c.). De behandeling met Temgesic wordt eventueel 's morgens herhaald indien mocht blijken dat een **muis/rat** nog tekenen van ongerief vertoont.

Apparaat en procedures

De haren op de hoofdhuid worden afgeschoren en verwijderd. Daarna wordt de **muis/rat** in de stereotakter gezet. Met behulp van twee stompe oorpennen, die in de gehoorgang van de **muis/rat** gebracht worden, en een bekklem voor de snijtanden, wordt de kop van de **muis/rat** gefixeerd.

Na desinfectie van de hoofdhuid met betadine wordt de schedel vrijgemaakt door een incisie in de hoofdhuid. Alle operatie materialen (scalpels, wondklemmen, naalden etc.) worden voor gebruik gesteriliseerd. De huid wordt zodanig gefixeerd dat de schedel goed bereikbaar is. Daarna wordt de schedel schoon en droog gemaakt met steriele watjes. De schedel wordt in een horizontale positie gebracht door de referentiepunten bregma en lambda op dezelfde hoogte in te stellen. Vervolgens wordt de middellijn (i.e., lijn door lambda en bregma) bepaald.

Nadat de **muis/rat** in het stereotactische frame is gefixeerd ligt het referentiepunt voor de interauraal lijn vast. Om het referentiepunt bregma/lambda te bepalen moet de ijknaald naar het bregma/lambda gebracht worden en deze coördinaten opgeschreven worden. Deze coördinaten moeten aangepast worden aan de gewenste atlascoördinaten. Dan wordt op de laterale en de anterior/posterior coördinaten de schedel doorboord tot aan de dura (diameter van boorgat 0.8 mm). Nadat het gat in de schedel is geboord wordt de dura mater met een injectienaald doorgeprikt. Vervolgens kan men met de naald of canule naar de van te voren vastgestelde dorsoventrale coördinaat.

Acute injectie van farmaca/DNA Plasmides

Voor eenmalige injecties worden farmaca/DNA plasmides met een speciale spuit (Hamilton™) in de hersenen geïnjecteerd. De spuit wordt langzaam naar de injectieplaats gebracht. Als die positie bereikt is wordt begonnen met het injecteren. De snelheidsnelheid is afhankelijk van het volume dat geïnjecteerd wordt. Indien een groot volume (meer dan 1 µl) wordt geïnjecteerd zal langzamer geïnjecteerd dienen te worden (0.5 µl/min). Indien een kleiner volume geïnjecteerd wordt (minder dan 1 µl) kan een snellere snelheid worden toegepast. Dit heeft te maken met het feit dat een groter volume meer tijd dient te krijgen om te diffunderen in het weefsel zodat er geen aanzienlijke schade wordt veroorzaakt door volumedruk. Om deze injectiesnelheid precies te bepalen wordt gebruikt gemaakt van een microinfusiepomp. Nadat de substantie is ingespoten wordt 1 min gewacht alvorens de spuit langzaam wordt teruggetrokken.

Electroporatie procedure DNA plasmides:

Om efficiëntie van de intracellulaire opname van DNA plasmides te verhogen wordt gebruikt gemaakt van electroporatie. Tien minuten na de craniale incisie en stereotactisch injectie van plasmide DNA (2.5 µg/µl in saline) worden 2 naaldelektrodes geplaatst op 1 mm anterior en 1 mm posterior van de injectieplaats. Vervolgens worden 5 geblokte pulsen gegeven op 1 Hz, met een duur van 50 ms en 125 µA. Contralateraal kan deze procedure herhaald worden.

Plaatsen van canules

Indien men meerdere malen een farmacon wil toedienen worden vaste canules geplaatst. Zodoende hoeft men de dieren niet telkens weer te narcotiseren. Eerst worden er twee verdere gaatjes in de schedel geboord. Hier worden schroefjes (M1x2) in gedraaid die als verankering voor de canule dienen. De roestvrijstale canules hebben een buitendiameter van 0.65 mm en de binnendiameter van 0.30 mm. De canule wordt naar de van tevoren bepaalde coördinaten gebracht. Met behulp van cement (Paladur™) wordt de canule op de schedel aan de schroefjes verankerd. Men dient ervoor te zorgen dat tijdens het aanbrengen van de cement de schedel droog blijft.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

, voorzitter
p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: (

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 19-12-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *“Effecten van perifere toediening van een TrkB agonist op lange termijn geheugen bij ratten”*, is op de DEC vergadering van 16 december 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) DEC vindt de ethische afweging erg algemeen beschreven bij punt 4. De DEC verzoekt dit toe te passen op de voorgestelde studie.
- 2) De DEC verzoekt de naam van de PI bij punt 6 te verwijderen en op het voorblad te vermelden. Het is niet de bedoeling dat verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 3) De DEC verzoekt de nieuw toegevoegde literatuur bij punt 5, ook op te nemen in de literatuurlijst.
- 4) Bij punt 7c verzoekt de DEC de uitleesparameter te vermelden en de uitval in een percentage aan te geven. Gelieve tevens aan te geven/verduidelijken dat de vergelijkingen binnen een en hetzelfde dier plaatsvinden met betrekking tot de groepsgrootte van 30. Tevens verzoekt de DEC de laatste 2 zinnen vanaf “Dit is echter enzovoort”, te verwijderen. Dit heeft als consequentie dat op het voorblad volstaan kan worden met de vermelding van één groep.
- 5) De DEC verzoekt de namen bij punt 8 te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 6) De DEC verzoekt bij punt 9b aan te geven dat pijnstilling wordt gegeven de eerste 2 dagen na de operatie. Dosering post-operatief wel verlagen: 0.01-0.05 mg/kg LG elke 8-12 uur herhalen.
- 7) De DEC merkt op dat de SOP over muizen gaat en de proef over ratten.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-162, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 5 februari 2012

Tel:

~ 5~

Betreft: Begeleidende brief bij aanpassing van DEC 2011-162

Beste,

We hebben de vragen en opmerkingen van de DEC (onderaan bijgevoegd) in overweging genomen en hebben volgende stappen ondernomen om de DEC aanvraag te verbeteren.

M.b.t. vraag 1

We hebben de ethische afweging aangepast tot:

Gezien het grote maatschappelijke belang van het begrijpen van normale en pathologische geheugenvorming, en het gebrek aan alternatieven die ons vergelijkbare inzichten kunnen geven, zijn wij van mening dat het voorgestelde experiment opweegt tegen het gebruik van de dieren zoals beschreven in deze aanvraag.

M.b.t. vraag 2 en 5

Op vraag van het DEC werden de namen van alle personen op de aanvraag verwijderd.

M.b.t. vraag 3

Alle referenties werden opgenomen in de literatuurlijst.

M.b.t. vraag 4

Uitlees parameters werden als volgt duidelijker gedefinieerd in de aanvraag:

-In praktijk wil dit zeggen dat dieren die consequent minder dan 7 seconden exploreren in de ORT niet gebruikt kunnen worden.

- Het niet meer kunnen injecteren van een dier omwille van een verstopping of pijn rondom de canule (infectie) zullen in dit geval redenen zijn om het dier uit experiment te halen

De gevraagde zin werd verwijderd en ook percentages en het within subject design werden duidelijker naar voren gebracht in volgend stuk:

"Het betreft een within design waarin alle dieren elke conditie ondergaan."

"Uit ervaring met vergelijkbare experimenten weten we dat we om een groep van 23 ratten te bekomen rekening moeten houden met een uitval. Het totale aantal ratten dat nodig is voor deze studie rekening houdend met de power-analyse én met de mogelijke uitval door exploratie of canuleplaatsing is 30. We hebben namelijk in het verleden ervaren dat ongeveer 4 dieren ($\pm 12,5\%$) ten gevolge van canule plaatsing, en ongeveer 3 dieren ($\pm 10\%$) door verminderde exploratie. Elk van de dieren ondergaat elke experimentele conditie."

Ten slotte werd het voorblad aangepast.

M.b.t. vraag 6

De gevraagde verandering in anesthesie richtlijnen (pijnstilling geven de eerste 2 dagen na de operatie. Dosering post-operatief: 0.01-0.05 mg/kg LG elke 8-12 uur herhalen.) werden doorgevoerd.

M.b.t. vraag 7

De bijgevoegde SOP is inderdaad geschreven voor het geval van muizen. Desondanks zijn de procedures bij ratten m.u.v. pijnstilling doseringen vergelijkbaar. Daarom is in de SOP muis vervangen door muis/rat en werden de pijnbestrijding richtlijnen voor zowel muis als rat ingevoerd.

Ik hoop hiermee uw vragen te hebben beantwoord. U kan mij altijd contacteren voor meer informatie.

Vriendelijke groeten,

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *"Effecten van perifere toediening van een TrkB agonist op lange termijn geheugen bij ratten"*, is op de DEC vergadering van 16 december 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- 1) DEC vindt de ethische afweging erg algemeen beschreven bij punt 4. De DEC verzoekt dit toe te passen op de voorgestelde studie.
- 2) De DEC verzoekt de naam van de PI bij punt 6 te verwijderen en op het voorblad te vermelden. Het is niet de bedoeling dat verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 3) De DEC verzoekt de nieuw toegevoegde literatuur bij punt 5, ook op te nemen in de literatuurlijst.
- 4) Bij punt 7c verzoekt de DEC de uitleesparameter te vermelden en de uitval in een percentage aan te geven. Gelieve tevens aan te geven/verduidelijken dat de vergelijkingen binnen een en hetzelfde dier plaatsvinden met betrekking tot de groepsgrootte van 30. Tevens verzoekt de DEC de laatste 2 zinnen vanaf "Dit is echter enzovoort", te verwijderen. Dit heeft als consequentie dat op het voorblad volstaan kan worden met de vermelding van één groep.
- 5) De DEC verzoekt de namen bij punt 8 te verwijderen. Het is niet de bedoeling dat verwezen wordt naar personen in de aanvraag, in verband met de Wet Openbaarheid van Bestuur.
- 6) De DEC verzoekt bij punt 9b aan te geven dat pijnstilling wordt gegeven de eerste 2 dagen na de operatie. Dosering post-operatief wel verlagen: 0.01-0.05 mg/kg LG elke 8-12 uur herhalen.
- 7) De DEC merkt op dat de SOP over muizen gaat en de proef over ratten.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
05-03-2012

Project: Effecten van centrale toediening van een TrkB agonist op lange termijn geheugen bij ratten.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals aangevraagd en geeft een positief advies.

*Postadres*Postbus 616
6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-162

Diersoort: rat

Aantal dieren: 30

Einddatum: 27-02-2016

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit nummer aan te vragen.

Dr. K. Hoenderken
Voorzitter DEC-UM

Dr. S. Heeneman
Vicevoorzitter DEC-UM