

37

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

Herziene versie

DECNR: 2011-009

Ontvangen: 24-02-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
25-03-2011	Nieuw / Herz.versie / Pilot

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

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

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	30972520N
--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Implementatie en validatie van het social defeat model; een pilot studie

startdatum **Maart 2011**

einddatum ⁹ **Juni 2011**

Duur van de proef¹⁰: 4,5 weken

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)			Art.9	
3. Verantwoordelijk medewerker (VM) GGO ⁷				
4. overige uitvoerenden			Art.9	
5.			Art. 12 i.o Art.9 Art.9	

Diergroep	1	2	3				
ctrl/exp/sham	exp	ctrl	interventie				
Diersoort	01	01	01				
Stam	C57Bl6	C57Bl6	CD1				
Construct / mutatie ?	-	-	-				
Herkomst (leverancier) *	01	01	01				
Aantal	20	10	27				
Geslacht	m	m	m				
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja				
Leeftijd/gewicht	8 wk	8 wk	20 wk				
Doel van de proef *	32	32	32				
Belang van de proef *	01	01	01				
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01				
Bijzondere technieken *	10	10	10				
Anesthesie *	04	04	04				
Pijnbestrijding *	01	01	01				
Mate ongerief *	05	04	03				
Toestand dier einde exp*	01	01	04				

* VHI-coderingen zie bijlage

1. Doel van de proef.

Dit pilot project dient om de 'social defeat' taak in de setting van de UM en meer specifiek de afdeling Neuroscience, in te voeren en de toepasbaarheid ervan te valideren.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Psychiatrische klachten op het gebied van depressie, angst en psychose komen veel voor, met grote last voor de patiënten hun familieleden en tevens voor de maatschappij. De etiologie van depressie, angststoornissen en psychose is slechts zeer beperkt bekend, en er is grote behoefte om de wetenschappelijke kennis over de betrokken neurobiologische mechanismen te verbeteren, om zodanig nieuwe preventie en interventie-mogelijkheden te ontwikkelen.

'Social defeat' oftewel het toebrengen van een sociale nederlaag is een goed gevalideerd experimenteel paradigma bij mannelijke muizen waarmee kenmerken van depressie, angst en psychose kunnen worden geïnduceerd (1-5). Gedurende de laatste jaren hebben een aantal zeer vooraanstaande studies laten zien dat dit paradigma uitermate geschikt is om op gevalideerde en translationeel-relevante wijze onderzoek te doen naar waarschijnlijk de meest voorkomende en belangrijkste risicofactor van psychiatrische stoornissen (2-4, 6).

Het geldt op dit moment als een van de meest bruikbare experimentele settings in de neurowetenschappen (7), en heeft een duidelijke relatie met humane sociale stress en een variëteit aan psychiatrische ziektebeelden, maar ook met de bestudering van de neurobiologie die ten grondslag ligt aan mentale weerbaarheid (3, 8). Dit model is dus van grote relevantie voor de bestudering van de neurobiologische processen die ten grondslag liggen aan depressie, angst en psychose.

3. Alternatieven

Gestandaardiseerd onderzoek op een mogelijke causale link tussen sociale defeat stress en psychiatrische klachten, en de onderliggende neurobiologische processen, is niet haalbaar in mensen. Enerzijds omdat het ethisch zeer gevoelig ligt. Anderzijds omdat er bij mensen slechts in zeer beperkte mate inzicht kan worden verkregen in de onderliggende neurobiologie vanwege de beperkte beschikbaarheid van neuronale weefsel vanwege voor de hand liggende ethische argumenten.

Social defeat stress kan niet in een in vitro model onderzocht worden. Muizen zijn wel zeer geschikt om dit als model te onderzoeken.

4. Ethische afweging

Op basis van de hierboven genoemde punten, biedt dit model van social defeat een uitermate geschikt methode om de effecten van sociale stress op het gedrag en neurobiologie van zoogdieren te onderzoeken. Identificatie van de causale neurobiologische mechanismen is van uitermate groot belang omdat hiermee nieuwe preventie- en interventie strategieën kunnen worden ontwikkeld die de prevalentie van de veel voorkomende psychiatrische aandoeningen zoals depressie, sociale fobie, en schizofrenie zouden kunnen verminderen. Dit is essentieel want op dit moment bestaan dergelijke strategieën niet.

De ethische gevoeligheid van deze studie is het feit dat muizen 10 dagen lang onderworpen worden aan social defeat (sociale nederlaag). Dit is zeer stressvol. Echter de onderzoekers zijn ervan overtuigd

dat het belang van de geplande studie opweegt tegen het ongerief van de dieren die hierbij betrokken zijn. Dit omdat deze studie inzicht zal geven in het ontstaan van psychiatrische aandoeningen bij de mens; of beter: waarom de ene mens wel en de andere niet depressief wordt na stress. Uiteraard zullen alle noodzakelijke maatregelen worden getroffen om het ongerief zoveel mogelijk te minimaliseren.

Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Alhoewel overtuigend onderzoek heeft laten zien dat sociale stress, en met name de zogenoemde 'social defeat' stress, sterk geassocieerd is met verschillende psychiatrische aandoeningen, zijn de onderliggende mediërende en modererende neurobiologische processen slechts zeer beperkt onderzocht.

De huidige studie dient als pilot-studie in het kader van het door NWO recent gehonoreerde VENI onderzoek van de VO naar de biologische mechanismen die betrokken zijn bij de mentale weerbaarheid naar het doormaken van ernstige sociale stress.

Eerder onderzoek naar social defeat

De laatste jaren is het onderzoek naar social defeat met name gedaan door de groep van professor Eric Nestler, die momenteel werkzaam is bij de Mount Sinai School of Medicine. Via de artikelen en persoonlijke communicatie met zijn medewerkers is de huidige pilot studie opgezet (3, 9).

Sociale nederlaag

'Sociale nederlaag' muizen worden bij dominante muizen in hun thuiskooi gezet. 10 minuten zitten ze bij elkaar en hierna wordt een transparant tussenschot met kleine openingen in de kooi gezet voor de resterende 24 uur zodat de muizen niet meer bij elkaar kunnen komen. Dit gebeurt 10 dagen achter elkaar, waarbij de sociale nederlaag muis iedere dag bij een andere dominante muis wordt gezet.

Tabel 1 is een overzicht van werkomstandigheden bij 3 verschillende studies over sociale nederlaag.

	Sociale nederlaag muizen	Dominante muizen	Arena	Additionele suggesties
Berton (2006)	C57Bl/6J (10-20 wk) Mannetjes	CD1 ($\pm$ 20 wk) Voormalige fokmannetjes	42 *42 cm wit plastic wire mesh 10*6.5 cm	Tussenschot thuis kooi plexiglas met gaatjes
Krishnan (2007)	C57Bl/6 (7 wk) Mannetjes	CD1 ($\pm$ 20 wk) Voormalige fokmannetjes	zie Krishnan (2008)	Metten enkele uren voor donkere fase
Krishnan (2008)	C57Bl/6 9 wk Mannetjes	CD1 ($\pm$ 20 wk) Voormalige fokmannetjes	44*44 cm wire mesh 10*6 cm	

Op basis van deze literatuur is de combinatie van CD1 muizen als agressor muizen voor muizen van C57Bl6 gevalideerd. Hierbij is bekend dat 55% van de muizen gevoelig zijn voor de social defeat stress, en dat 45% daar relatief ongevoelig (gemeten met de social-avoidance test 24 uur na de laatste sociale nederlaag) voor is (3). Gevoelige muizen hebben een andere genexpressie in specifieke hersengebieden: de hippocampus, het ventraal tegmentale gebied en het ventrale striatum (1, 3, 10).

Eerder onderzoek (o.a. van VO) heeft laten zien dat epigenetische processen van cruciaal belang zijn bij de neurobiologische response na blootstelling aan stress, en dat epigenetische processen verouderings-gerelateerde veranderingen laten zien (11-13). Zo hebben de Maastrichtse onderzoekers aangetoond middels immunohistochemie dat veroudering gepaard gaat met i) verhogingen in het epigenetische-relevante eiwit DNMT3a (12), en ii) verhogingen van 5-methyl cytidine (5-mC; een belangrijke epigenetische marker die meestal gepaard gaat met verminderde gen transcriptie; artikel is recent gesubmit) in de hippocampus van muizen.

De vraagstellingen voor het huidige onderzoek is:

- Is social defeat een valide experimenteel paradigma in de setting van de afdeling Neuroscience en komen de effecten in social-avoidance taak overeen met die in de literatuur.
- Hebben muizen die gevoelig zijn voor social defeat stress een ander nivo van DNMT3a en 5-mC in

de hippocampus, in het ventaal tegmentale gebied, en het ventrale striatum t.o.v. muizen die niet gevoelig zijn voor social defeat stress (gemeten met de social-approach avoidance test), en ten opzichte van controle muizen

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit project is door

, Faculty of Health, Medicine and Life Sciences, Universiteit
Maastricht, beoordeeld en goedgekeurd.

Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Soort/stam:

C57Bl/6 muizen (leeftijd ongeveer 8 weken)

en CD 1 muizen (voormalige fokmannetjes, leeftijd ongeveer 20 weken).

Eindbestemming: alle dieren zullen na het beëindigen van de experimenten geëuthanaseerd worden middels perfusie ter verkrijging van weefsel (hersenen).

Herkomst van de muizen: Harlan of CPV.

7b. Sexe

Vanwege de aard van de sociale stress (sociale stress door een dagelijks nederlaag middels een gevecht) is het experiment alleen toepasbaar bij mannelijk muizen.

7c. Aantallen

De pilot zal gedaan worden met

10 C57Bl/6 controle muizen,

20 C57Bl/6 muizen blootgesteld aan sociale nederlaag (social defeat)

27 CD1 dominante muizen.

We hebben nog geen ervaring met de social defeat taak (vandaar deze pilot) en de aantallen zijn gebaseerd op de literatuur. Het laagste aantal social defeat muizen in een groep dat gebruikt werd in de sociale avoidance test met een verschil tussen resiliënt en non-resiliënt muizen was 9 (4; Figuur 2A). De verwachting is dat ongeveer 50% van muizen gevoelig is voor de 'social defeat', zoals gemeten met de sociale avoidance test (3). Derhalve hebben we het aantal muizen dat blootgesteld wordt aan sociale nederlaag (social defeat) op 20 gesteld. Een poweranalyse is niet mogelijk omdat in de artikelen meestal tot 30 dieren per groep zitten (2,3,4). Daarna worden deze dieren voor allerlei moleculaire biologische studies gebruikt. Vandaar dat men steeds veel dieren test omdat deze nodig zijn voor veel biochemische studies. Een uitzondering was de studie in Fig 2A van referentie 4. Echter het was niet te achterhalen hoe groot de groep was waarmee de groep van 9 dieren vergeleken werd. Vandaar dat op basis van literatuur helaas geen realistische power analyse mogelijk is.

In feite zijn 20 dominante CD1 muizen nodig. De literatuur vermeldt dat 'resident mice were CD1 breeders selected for their attack latencies reliably shorter than 30 s upon 3 consecutive screening tests' (4). Helaas wordt er niet vermeld hoeveel van de muizen aan dit criterium voldoen. Wij gaan ervan uit dat 25% wel eens niet genoeg agressief gedrag zou kunnen laten zien. Derhalve zullen we 27 dominante CD1 muizen includeren: $(a-0.25a)=20 \rightarrow 0.75a=20 \rightarrow a=27$.

Ongeveer 50% van de dieren vertoont na social defeat in de social avoidance test dat ze een dominante muis vermijden. De andere dieren doen dat nog steeds niet en zijn derhalve resiliënt in dit opzicht. Onderzoek heeft laten zien dat dit ook geldt voor het gedrag in de sucrose preferentie test (anhedonia test voor depressie), dwz 50% van de dieren laat geen effect zien (3). Maar in zero maze (angst) en de corticosterone response na de forced swim test (helplessness/despair test voor depressie) blijkt dat alle social defeat dieren toch aangetast zijn in hun gedrag ten opzichte van controle muizen (4). Derhalve is het van belang om een controle groep mee te nemen en te onderzoeken of alle social defeat dieren toch aangetast zijn voor wat betreft angst en bepaalde symptomen van depressie.

Dierproef

8. Experiment

Mannelijke muizen (C57Bl6) worden bij dominante muizen (CD1) in hun thuishok gezet. 10 minuten zitten ze bij elkaar en hierna wordt een tussenschot in de kooi gezet. Dit gebeurt 10 dagen achter elkaar, waarbij de C57Bl6 muis iedere dag bij een andere dominante muis wordt gezet en telkens opnieuw een sociale nederlaag ervaart.

Na blootstelling aan deze chronische sociale stress wordt het gedrag van de muizen getest, en worden de muizen uiteindelijk middels perfusie-fixatie ge-euthanaseerd bij een leeftijd van 12 weken ge-euthanaseerd. Gedurende de gedragstaken hebben de muizen individuele housing.

Experimentele blootstelling

Social defeat

Muizen uit de experimentele groep worden blootgesteld aan sociale nederlaag stress voor 10 opeenvolgende dagen. Elke experimentele muis wordt op elke dag gedurende 10 minuten in de kooi van een onbekende residentiele muis, en ondergaat daarbij een sociale vernedering. Residentiele muizen zijn CD1 fokkende muizen die worden geselecteerd op een aanvals-latentietijd van minder 30 seconden in 3 opeenvolgende tests. Na deze 10 minuten van fysieke nabijheid en interactie, blijven de experimentele en residentiele muis de gehele dag in sensorisch contact (maar zonder fysiek contact) doordat er een geperforeerd plexi-glas verdeelstuk in de kooi is geplaatst. De experimentele muizen worden elke dag blootgesteld aan een nieuwe residentiele CD1 muis in zijn kooi.

Gedrags-testen

Social approach-avoidance (benadering-vermijdings) gedrag

Het benaderings-vermijdings gedrag van de experimentele muizen wordt gemeten door de tijd en mate van de bewegingen te meten die de muizen naar of van een onbekend sociaal target (i.e. een andere muis). De arena is een witte plastic open veld (42 x 42 cm) die in het donker staat. Video-opnamen worden uitgevoerd met behulp van een camera uitgerust met een infrarood filter en verlichting. Elke experimentele muis wordt geïntroduceerd in het open veld (de arena) en de bewegingsbaan wordt bijgehouden voor twee opeenvolgende sessies van 2,5 min. Deze duur die gekozen is voor een optimale gevoeligheid / doorvoer ratio. Tijdens de eerste sessie ("zonder sociaal target") bevat de open veld arena een lege kooi (10 x 6,5 cm) die zich aan een kant van het veld bevindt. Tijdens de tweede sessie ("met sociaal target") zijn de omstandigheden identiek, behalve dat een sociaal target dier (een onbekende CD1 mannelijke muizen) in die kooi wordt geplaatst. Tussen de 2 sessies wordt de experimentele muis uit de arena gehaald en teruggeplaatst in zijn kooi voor ongeveer een minuut. De videotracking gegevens in de situatie bestaande uit "zonder sociaal target" en "met sociaal target" worden gebruikt om de tijdsbesteding van de experimentele muis in de "interactie zone" (een 8 cm brede strook rondom de kooi) en de "hoeken" van de open veld tegenover de locatie van de kooi te bepalen.

Angst-achtig gedrag

Zero maze: de zero-maze is gemaakt van zwart plastic (transparant voor infrarood licht) die uit een cirkelvormige baan (50 cm in diameter, 5 cm breed pad, 70 cm boven vloer niveau) bestaat, en verdeeld is in twee open en twee gesloten delen die tegenover elkaar liggen. De baan is afgesloten met 25 cm hoog zijwanden. De muis wordt in een van de open delen geplaatst en wordt geconfronteerd met een gesloten deel en kan het doolhof verkennen gedurende 5 minuten. De totale en relatieve duur en afgelegde afstand in open en gesloten gedeeltes worden gemeten in omstandigheden met weinig licht (1-2 lux) via een infrarood-videocamera die aangesloten is op een video-tracking systeem (Ethovision Pro, Noldus, Nederland) (4).

Depressief gedrag

A. Forced Swim Test: deze test waarin de muizen worden geforceerd om te zwemmen om zodanig te voorkomen te verdrinken. Het is een bekende screeningtest voor antidepressiva bij knaagdieren (4). Vier cilindrische glazen tanks (40 cm lengte x 19 cm diameter) met 25 ° C water, gevuld tot een diepte van 30

em, zullen worden gebruikt in deze test. Alle dieren worden in eerste instantie onderworpen aan een pre-test sessie waarin elk dier gedurende 15 minuten in het water wordt geplaatst. De volgende dag worden de dieren opnieuw getest door ze gedurende 5 minuten (test sessie) te plaatsen in het water. Hun bewegingen worden vanaf opzij geregistreerd met behulp van een videocamera. Immobilititeit wordt als volgt gedefinieerd: het maken van geen bewegingen of alleen het maken van die bewegingen die nodig zijn om de neus boven water te houden. Zwemmen is gescoord als het dier actieve zwembewegingen maakt (dwz horizontaal bewegen of kruising onder het wateroppervlak). Klimmen bestaat uit opwaartse bewegingen met de voorpoten in en uit het water gericht tegen de muren van de cilinder. Seoren van het latere gedrag gebeurt automatisch via een video-tracking systeem (Ethovision Pro, Noldus, Nederland) aangesloten op de videocamera.

B. Sucrose Preferentie Test: Anhedonie is een van de belangrijkste symptomen van depressie en het betreft een 'verlies van de gevoeligheid voor plezierige gebeurtenissen', of een algemene daling van de gevoeligheid voor beloningen'. Het is gebleken dat chronische blootstelling aan een verscheidenheid van stressoren anhedonie kan induceren bij ratten en muizen (4). De sucrose-preferentie-test is de best-gevalideerde test voor het meten van anhedonie bij knaagdieren. Deze test wordt meestal uitgevoerd bij het begin van de donkere fase, want dit is de actieve fase van knaagdieren. De muizen worden gehandhaafd op een 12-h licht / donker schema, met de donkere fase vanaf 06.00h. De muizen zijn gewend aan sacharose door dat zij alleen water met 1% sacharose krijgen gedurende twee dagen. Tijdens de sucrose preferentie-test, krijgen alle muizen geen voedsel gedurende 6 uur, vanaf 09.00u in de ochtend, waarna ze zijn toegestaan om te drinken uit een fles gevuld met een 1% sacharose-oplossing (50 ml) of een met 1% sucrose oplossing gedurende een uur. Voor en na deze test worden de flessen gewogen om het totale verbruik te controleren.

Corticosteron metingen:

Corticosteron in het bloed wordt gemeten om een fysiologische meting van de mate van stress en / of depressie bij een knaagdier te verkrijgen. Bloedmonsters van ongeveer 70 µl worden genomen middels een venapunctie in de vena saphena (Peins et al., 1998). De bloedafnames worden 2 keer uitgevoerd: 1 keer vlak voor de Forced Swim task, en 1 keer 10 minuten na de Forced Swim task.

Immunohistochemische analyses:

Na perfusie-fixatie (See SOP hieronder), worden de hersenen serieel gesneden in 30 micrometer coronale coupes met behulp van een cryostaat en verdeeld in 10 subseries die voor de immunohistochemische analyses zullen worden gebruikt.

Tijdsplanning:

Week 8: start experiment

10 dagen social defeat

dag 11: social interaction test (social approach-avoidance test)

dag 13 en 14: sucrose preferentie test

dag 18: zero maze test

dag 20-21: forced swim task en corticosterone meting

dag 29: euthanasie middels perfusie-fixatie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Er is geen reden voor het gebruik van anesthesie in de voorgestelde experimenten.

Bij het uitvoeren van de perfusies zal gebruik worden gemaakt van pentobarbital injectie 100mg/kg (i.p.).

Voor uitvoerige beschrijving zie SOP's: Perfusie.

9b. Pijnbestrijding

Er is geen directe reden voor het gebruik van pijnstilling in de voorgestelde experimenten.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

Alle muizen die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten, worden aan het eind van het experiment geëuthanaseerd middels perfusie.

Humane eindpunten: tijdens het experiment zal een 'Welzijnsdagboek' worden bijgehouden.

Indien een dier meer ongerief ondervindt dan verwacht (bv. lusteloosheid/apathie (te zien aan minder beweging, stil zitten in kooi), extreem gewichtsverlies (>15% in 2-3 dagen), tekenen van pijn en/of infectie (minder beweeglijk, verminderde eetlust, evt. temperatuurverhoging, verwonding als gevolg van gevechten) etc.), zal de dierproefdeskundige (art. 14) worden ingeschakeld en, indien nodig, zal pijnmedicatie worden toegediend en/of zal er besloten worden het dier te euthanaseren middels perfusie.

10a. Ongerief



Ongerief	Freq.	Duur	1	2	3
A: Social defeat test	10x	10	05	nvt	04
B: Indiv.huisvesting	nvt	doorlopend	03	03	03
C: Sucrose pref. test	1x	6h	03	03	03
E: Zero Maze	1x	20'	03	03	03
F: Forced Swim test	2x	30'	04	04	04
G: Corticosterone	1x	30'	04	04	04
H: Perfusion	1x	1'	02	02	02

Extra uitleg bij de ongerief scores:

A: De social defeat test leidt tot ernstige stress (05) bij de experimentele muizen en tot matige tot ernstige stress (04) bij de CD1 muizen. De controle muizen worden niet aan social defeat blootgesteld.

B: Individuele huisvesting is noodzakelijk en veroorzaakt matige stress (03)..

C: Sucrose preferentie test omvat 6h vasten en geeft aanleiding tot matige stress (03)

D: de social approach-avoidance test gebeurt 2 keer 2.5 minuut, en geeft aanleiding tot geringe/matige stress (02)

E: de zero maze test geeft aanleiding tot matige stress (03)

F: de water stress geeft aanleiding tot matige/ernstige stress (04)

G: corticosterone metingen: matige/ernstige stress stress (03).

H: I.P. injectie voor sedatie voorafgaand aan de perfusie: matig/geringe stress/pijn (02). Elk dier zal een éénmalige injectie krijgen van 100mg/kg Pentobarbital voorafgaand aan de perfusie.

10b. Welzijnsevaluatie

Het welzijn zal worden geëvalueerd, zodat er in volgende experimenten rekening mee gehouden kan worden. Voor zover bekend zijn er geen data voor welzijnsevaluatie tot dusver hierover beschikbaar. Deze informatie is wel opgevraagd bij de onderzoekers die het social defeat model reeds toepassen, op basis waarvan het werkplan eventueel zal worden aangepast.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen tot het experiment in groepen worden gehuisvest op locatie CPV Universiteit Maastricht. Het wisselen van de kooien en voedselverstrekking ad libitum zal door de medewerkers van het CPV worden uitgevoerd. De experimenten zullen worden uitgevoerd op het CPV. Tijdens het experiment zullen controle dieren per twee in een kooi zitten met een tussenschot ertussen. De sociale defeat dieren zitten samen met een dominant dier in 1 kooi met een tussenschot ertussen.

In geval van calamiteiten zal de VO worden gecontacteerd.

12. Deskundigheid

De verantwoordelijk onderzoeker artikel 9 gecertificeerd. De experimenten zullen worden uitgevoerd door s (art. 12 in opleiding), met verdere begeleiding door deze personen zijn allen artikel 9 gecertificeerd en hebben jaren lange ervaring met het werken met proefdieren.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Formatted: English (U.S.)

Formatted: Font: 11 pt, English (U.S.)

Formatted: English (U.S.)

Formatted: Font: 11 pt, English (U.S.)

Perfusies

De dieren krijgen een pentobarbital injection van 100mg/kg (i.p.). Wanneer de muis onder complete anaesthesie is (beoordeeld door testen van primitieve reflexen), wordt de buikholte en peritoneum geopend, waarna het diafragma geopend wordt. Een naald die gekoppeld is aan een pompsysteem wordt vervolgens in de apex van het hart gestoken waarna de pomp met thyrode buffer wordt aangezet, en de rechter boezem van het hart wordt geopend ter afvoer van de vloeistof. De buffer wordt na 1 minuut vervangen door Somogyi fixatie buffer (4% paraformaldehyde, 15% picric acid, 0.05% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer). Na 12 minuten Somogyi fixation wordt de muis ge-decapiteerd ende hersenen worden voorzichtig verwijderd voor verder onderzoek.

Formatted: Highlight

Formatted: Font: 11 pt, Highlight

Formatted: Highlight

Formatted: Dutch (Netherlands)

Formatted: Font: 11 pt, Dutch (Netherlands)

Formatted: Dutch (Netherlands)

Relevante literatuur

1. Cao JL, Covington HE, 3rd, Friedman AK, Wilkinson MB, Walsh JJ, Cooper DC *et al.* Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *J Neurosci* Dec 8; 30(49): 16453-16458.
2. Krishnan V, Han MH, Mazei-Robison M, Iniguez SD, Ables JL, Vialou V *et al.* AKT signaling within the ventral tegmental area regulates cellular and behavioral responses to stressful stimuli. *Biol Psychiatry* 2008 Oct 15; 64(8): 691-700.
3. Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 2007 Oct 19; 131(2): 391-404.
4. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 2006 Feb 10; 311(5762): 864-868.
5. Selten JP, Cantor-Graae E. Social defeat: risk factor for schizophrenia? *Br J Psychiatry* 2005 Aug; 187: 101-102.
6. van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature* Nov 11; 468(7321): 203-212.
7. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008 Oct 16; 455(7215): 894-902.
8. Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* 2009 Jun; 10(6): 446-457.
9. Covington HE, 3rd, Vialou V, Nestler EJ. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. *Neuropharmacology* Mar-Apr; 58(4-5): 683-693.
10. Vialou V, Robison AJ, Laplant QC, Covington HE, 3rd, Dietz DM, Ohnishi YN *et al.* DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat Neurosci* Jun; 13(6): 745-752.
11. Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F *et al.* Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* Apr; 90(4): 498-510.
12. Chouliaras L, van den Hove DL, Kenis G, Cruz JD, Lemmens MA, van Os J *et al.* Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain Behav Immun* Dec 17.
13. Rutten BP, Mill J. Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull* 2009 Nov; 35(6): 1045-1056.



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, 02-02-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: *"Implementatie en validatie van het social defeat model; een pilot studie"*, is op de DEC vergadering van 28 januari 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC verzoekt de aanvraag in één taal aan te leveren.
- * De DEC verzoekt op het voorblad het deelproject aan te geven van H&G en de geplande startdatum aan te passen.
- * Op het voorblad de leeftijd per kolom aanpassen zoals beschreven bij punt 5 in de tabel.
- * De DEC begrijpt de laatste zin van punt 3 niet en verzoekt dit toe te lichten.
- * De DEC verzoekt de ethische gevoeligheden te vermelden bij de ethische afweging.
- * Bij punt 6 verzoekt de DEC achter "goedgekeurd" een punt te zetten en de rest van de tekst te verwijderen.
- * De DEC merkt op dat de pilot van een dusdanig aantal dieren is, dat enige onderbouwing van het aantal dieren gewenst is en dat daarom een powerberekening noodzakelijk is. De DEC verzoekt de uitval van de CD1 muizen als percentage uit te drukken op basis van de aangegeven referentie.
- * De DEC vraagt zich af waarom de 10 dieren die niet reageren op de social-defeat, niet gebruikt kunnen worden als controlegroep. Als de controlegroep noodzakelijk is, moet deze dan ook dezelfde handelingen ondergaan als de 2 experimentele groepen, behalve de social defeat?
- * Graag consistentie ten aanzien van de duur en de doelstelling van het social defeat in het hele protocol (discrepancie in de Nederlandse en Engelse tekst)
- * Volgens de DEC zijn er geen dieren opgenomen voor het selecteren van de CD1 muizen op hun aanval bereidheid.
- * Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief per groep aan te geven. Het toegedane ongerief moet eveneens vermeld worden bij het ongerief. Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a moet in overeenstemming zijn.

Conclusie.

Het project wordt aangehouden.

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 **2011-009**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

From: [redacted]
 Sent: donderdag 24 februari 2011 21:31
 To: [redacted]
 Cc: [redacted] (CPV); [redacted]
 Subject: RE: Project 2011-009-nieuw
 Attachments: DEC_aanvraag_04_01_2010_versie2.docx; DEC aanvraag_04_01_2010 voorblad versie2.doc

Geachte leden van de DEC,

Naar aanleiding van uw commentaar op onze projectaanvraag: "*Implementatie en validatie van het social defeat model; een pilot studie*", hebben we de aanvraag verbeterd, en hieronder (naast de grijs-gemarkeerde stukken in de tekst van de aanvraag) op elk van de door U genoemde punten gereageerd.

In de bijlages vindt u de herziene versies van het voorblad en van de projectaanvraag.

We hopen dat deze veranderingen uw vragen op voldoende wijze hebben beantwoord en dat deze herziene aanvraag tijdens de volgende DEC vergadering kan worden besproken.

De antwoorden op uw vragen staan hieronder per punt gegeven:

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- * De DEC verzoekt de aanvraag in één taal aan te leveren.
 - o Aangepast
- * De DEC verzoekt op het voorblad het deelproject aan te geven van H&G en de geplande startdatum aan te passen.
 - o Aangepast
- * Op het voorblad de leeftijd per kolom aanpassen zoals beschreven bij punt 5 in de tabel.
 - o Aangepast
- * De DEC begrijpt de laatste zin van punt 3 niet en verzoekt dit toe te lichten.
 - o Deze laatste zin is verwijderd en een extra toelichtende zin is erbij geschreven.
- * De DEC verzoekt de ethische gevoeligheden te vermelden bij de ethische afweging.
 - o Aangepast
- * Bij punt 6 verzoekt de DEC achter "goedgekeurd" een punt te zetten en de rest van de tekst te verwijderen.
 - o Aangepast
- * De DEC merkt op dat de pilot van een dusdanig aantal dieren is, dat enige onderbouwing van het aantal dieren gewenst is en dat daarom een powerberekening noodzakelijk is. De DEC verzoekt de uitval van de CD1 muizen als percentage uit te drukken op basis van de aangegeven referentie.
 - o Dit wordt nu onder punt 7 uitgebreid onderbouwd.
- * De DEC vraagt zich af waarom de 10 dieren die niet reageren op de social-defeat, niet gebruikt kunnen worden als controlegroep. Als de controlegroep noodzakelijk is, moet deze dan ook dezelfde handelingen ondergaan als de 2 experimentele groepen, behalve de social defeat?
 - o Dit aspect wordt nu eveneens onder punt 7 onderbouwd.
- * Graag consistentie ten aanzien van de duur en de doelstelling van het social defeat in het hele protocol (discrepancie in de Nederlandse en Engelse tekst)
 - o Aangepast
- * Volgens de DEC zijn er geen dieren opgenomen voor het selecteren van de CD1 muizen op hun aanval bereidheid.
 - o Dat klopt. We gaan ervan uit dat als een CD1 muis niet aanvalt, hij meteen vervangen wordt door de extra CD1 muizen die we achter de hand hebben hiervoor. Op deze

manier besparen we muizen die gebruikt zouden worden om de agressiviteit te testen van de CD1 muizen.

- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief per groep aan te geven. Het toegedane ongerief moet eveneens vermeld worden bij het ongerief. Het ongerief op het voorblad en bij punt 10a moet in overeenstemming zijn.

- Aangepast

Met vriendelijke groet,

Van:

Verzonden: vrijdag 21 januari 2011 12:22

Aan:

Onderwerp: Project 2011-009-nieuw

Geachte Onderzoeker,

Het secretariaat DEC-UM heeft Uw nieuwe project aanvraag:

"Implementatie en validatie van het social defeat model; een pilot studie" in goede orde ontvangen.

Uw aanvraag zal behandeld worden op de vergadering van de DEC-UM op **28 januari 2011**.

U krijgt uiterlijk in de week van 31 januari/1 februari 2011 bericht per mail over de conclusie van de DEC-UM.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk secretaris

Postbus 616, 6200 MD Maastricht T

E-mail:

Werktijden:

28-2-2011

Aan:

Ons kenmerk *Doorkiesnummer* *Maastricht*
29-03-2011

Project: Implementatie en validatie van het social defeat model; een piloot studie.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO): _____

Secretariaat DEC-UM

Hierbij 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**.

Projectnummer: 2011-009
Diersoort: muis
Aantal dieren: 57
Einddatum: 25-03-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

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.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM