

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

DECNR: 2011-039**Aangepast voorblad****Ontvangen: 03-05-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
31-03-2011	Nieuw

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

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 3097 3508N

Titel van het onderzoek:

Effect of medial prefrontal cortex stimulation on neuronal firing activitystartdatum **1-4-2011** einddatum⁹ **1-4-2014** *Duur van de proef¹⁰: 1 dag*

Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art.9	
2. Vervanger VO1 (VVO)			Art.9	
3. overige uitvoerenden			Art.9	
4. overige uitvoerenden			Art.9	
5. Vervanger VO2				

Diergroep	mPFC	Witte	3	4	5.	.	.
ctrl/exp/sham	Exp	Exp					
Diersoort	Rat	Rat					
Stam	Sprague Dawley	Sprague Dawley					
Construct / mutatie ?	-	-					
Herkomst (leverancier) *	02 (CR)	02 (CR)					
Aantal	7	9					
Geslacht	M	M					
Dieren immuuncompetent ?	ja ⁸	ja ⁸					
Leeftijd/gewicht	10 wkn	10 wkn					
Doel van de proef *	32	32					
Belang van de proef *	01	01					
Toxicologisch onderzoek *	01	01					
Bijzondere technieken *	10	10					
Anesthesie *	04	04					
Pijnbestrijding *	01	01					
Mate ongerief *	01	01					
Toestand dier einde exp*	01	01					

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

(kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. nov.'05)

Titel: Effect of medial prefrontal cortex stimulation on neuronal firing activity

1. Doel van de proef.

Recently, deep brain stimulation (DBS) has been shown to be effective in the treatment of patients with major depressive disorder (Mayberg et al., 2005; Sartorius et al.; Schlaepfer et al., 2007). However, the mechanisms underlying the anti-depressant effect of brain targets for stimulation remain unknown. Therefore, in this study we aim to unravel the neural circuit for mood-related behaviours using previously established methods (Temel et al., 2007). Firstly, we will stimulate the medial prefrontal cortex (mPFC) and its adjacent white matter; at the same time electrophysiological recording will be performed in the mediodorsal thalamus, nucleus accumbens (NAc) core (according to the coordinates of Clement), and/or dorsal raphe nucleus mainly to test the hypothesis that these regions could be part of the neural circuit underlying the mood-related effects of stimulation.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Major depression is the most common of all psychiatric disorders with a life-time prevalence of 16.2% for the US (Kessler et al., 2003) and 14% for Europe (Alonso et al., 2004). It is ranked as the fourth leading cause of societal burden among all diseases (Organization, 2001). Nevertheless, approximately 20% fail to respond to these standard therapies and nearly 60% may not achieve adequate response (Fava, 2003; Mayberg et al., 2005; Ressler and Mayberg, 2007). Recently, Mayberg and associates performed chronic electrical brain stimulation in six patients with treatment-resistant depression (Mayberg et al., 2005). Electrodes were implanted in the anterior (subgenual) cingulate gyrus and DBS induced a striking and sustained remission of depressive symptoms. Similarly, Schlaepfer *et al.* found significant improvement of depressive symptoms with DBS of the NAc in three patients, which is considered to be a key region in the reward circuit (Schlaepfer et al., 2007). The use of stimulation electrodes implanted in the brain to control severely disabling psychiatric and neurological conditions is an exciting and fast emerging area of clinical neuroscience (Perlmutter and Mink, 2006; Schiff et al., 2007; Wichmann and Delong, 2006). Its popularity is directly related to its minimal invasiveness, reversibility (stimulation can be turned off), and adjustability (various combinations of stimulation settings are possible).

3. Alternatieven

Unfortunately there is no alternative for the proposed animal experiment. To assess the functional relation between the stimulated regions and the target nuclei the usage of animals is necessary. There will be an extensive assessment of the neuronal responses of the diverse nuclei during stimulation of the mPFC and the adjacent white matter. Such an experiment is in humans medically and ethically not allowed. The usage of *in vitro* models is excluded, since in an *in vitro* model the stimulation and registration are not possible, since the connections between the nuclei are lacking.

4. Ethische afweging

Deliberation on the ethical issues of DBS in human subjects and the unavailability of human experimental brain samples restrict us to perform animal experiments. Research using animal models is necessary for better interpretation and analysis of the neurobiological mechanisms. We are confident that the proposed animal experiments and suffering of the animals will weight up against the new information that is going to be obtained from this study.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

The rationale for performing electrical stimulation at the level of the anterior cingulate or medial prefrontal cortex has been derived from a set of experiments focusing on neuronal activity patterns in depressed patients and in animal models of depression. Clinical studies have consistently shown that the subgenual cingulate gyrus, part of the anterior cingulate gyrus (Haznedar et al., 2004) and anatomically known as the Brodmann area 25, is involved in acute sadness (Mayberg et al., 1999; Ressler and Mayberg, 2007). Based on anatomical connections and cytoarchitectural features, the medial prefrontal cortex, particularly the infralimbic cortex, is the region most commonly suggested as the anatomical correlate of BA 25 (Gabbott et al., 2003; Takagishi and Chiba, 1991).

In addition, anti-depressant effects of drugs, electroconvulsive therapy, ablative surgery and also DBS have been found to be selectively correlated with a decrease in anterior cingulate activity (Dougherty et al., 2003; Mayberg et al., 2000; Mayberg et al., 2005; Mottaghy et al., 2002; Nobler et al., 2001). In animal models of depression, similar results have been reported. The anterior cingulate has been found to be involved both in the pathophysiology and in the mediation of anti-depressant effects of drugs in rodents (Kuipers et al., 2006; Slaterry et al., 2005). Potential antidepressant effects of the mPFC electrical stimulation in animals have been investigated in detail (Hamani et al.; Hamani and Nobrega). Nevertheless, the mechanism by which DBS of these regions improves mood-related behaviours remains largely unknown.

Importantly, these findings demonstrated that DBS could possibly affect the downstream connections of the limbic-cortical pathway, mainly on the serotonin (5-HT) system. As a consequence this induces profound changes in mood-related behaviors. In this respect, it is notable that depression has long been associated with the reduced functioning of 5-HT neurons in the midbrain (Bhagwagar et al., 2002; Mann, 2003; Smith et al., 1997). Since both the ACg and the NAc are connected with midbrain 5-HT neurons (Booij et al., 2006; Peyron et al., 1998; Wrase et al., 2006), it predicts the existence of a disrupted neural circuit that can be influenced by DBS both in patients and animals models (Mayberg et al., 2005; Ressler and Mayberg, 2007; Schlaepfer et al., 2007). These systems are actually interconnected through monosynaptic and polysynaptic connections (Groenewegen et al., 1990; Parr-Brownlie et al., 2007; Peyron et al., 1998; Temel et al., 2007) and expected to be part of the neural circuit underlying the mood-related effects of stimulation. The aim of this proposal is to unravel this neural circuit thereby using previously established methods (Temel et al., 2007), with electrophysiological recording in these target regions.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Our study design is positively judged by a peer-review committee of the Dutch organization for scientific research (NWO). And is being financed by the NWO. This DEC proposal is reviewed and positively judged by the expert in the field of DBS and depression,

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In this experiment we will use male Sprague-Dawley rats (10 weeks old, Charles River) At the end of the experiment the rats will be sacrificed and the brains will be used for immunohistochemical and morphological analyses.

7.b. Sexe

In this experiment male rodents will be used. The usage of females is not possible, since the short estrogen cyclis may interfere with the diverse neurotransmitter systems. In male rats the hormonal status is more stable and therefore acquired data will be less variable.

7.c. Aantallen

For the proposed experiment the animals will be split into two groups with different amount of animals per group. In the experiment we have two stimulation groups: stimulation of the mediale prefrontale cortex (mPFC) and stimulation of the white matter adjacent to the mPFC. For the mPFC group we will register neurons in 3 brain areas (NAc, thalamus, raphe) and for the white matter group 4 areas (NAc, thalamus, raphe en mPFC).

Based on the literature and earlier experiments with electrophysiologic recordings we expect an effect of 30% (δ), a spread of 25% (σ), a significance of 0.05 (α) and a power of 80% (π).

In particular the parameters for the power calculation are based on earlier research within our research group in collaboration with the Universities of Oxford and Toronto.

From these values we calculated that the number of neurons per group needs to be:

$$N = 15.7 * (0.25/0.30)^2 = 10.9$$

Per stimulation group this means:

$$\text{mPFC} \quad 10.9 * 3 (\text{areas}) = 32.7$$

$$\text{WS} \quad 10.9 * 4 (\text{areas}) = 43.6$$

Based on earlier experiments we are able to record 6 neurons per rat for these kind of experiments. To have enough neurons per group this means that we need respectively 5.5 and 7.3 rats per group to have enough neurons.

Besides we expect based on earlier experiments to have a loss of 10% due to surgical intervention and anesthesia. This means that the experimental groups have to be:

$$\text{mPFC: } N = 5.5/0.9 = 6.1 = 7 \text{ rats.}$$

$$\text{White matter: } N = 6.2/0.9 = 8.1 = 9 \text{ rats.}$$

8. Experiment

In this study we assess the neuronal responses to high frequency stimulation of the mPFC and the adjacent white matter in the rat. The aim of this experiment is explain the observed behavioral effect of mPFC stimulation for depression by assessing the neuronal responses of the target structures. Therefore rats will be randomised into two groups:

1. mPFC stimulation
2. white matter stimulation

Electrophysiologie procedure

Rats will be anesthetized with urthane to perform electrophysiological measurements, in which the extracellular neuronal activity will be visualized and consecutively saved on a computer for off-line data-analysis. During the recordings of the neuronal extracellular activity of the target structures (thalamus, NAc, raphe [and mPFC]), the mPFC (bregma AP +2.7, ML +1.2, VD -5.2) or the white matter (bregma AP +2.7, ML +2.0, VD -5.2) will be stimulated (200 μ A, 90 μ s, 130Hz). At the end of the registration session the last site will be marked by an electrophoretic injection of Pontamine Sky Blue using a negative current of 20 μ A (see also: DEC 2008-145, 2008-126, 2010-189).

Operatie procedure

All surgical manipulations (intracranial electrodes and/or canula implantation and intracerebral injections) will be performed under aseptic circumstances.

Einde experiment

After the electrophoretic injection the rat will be perfused transcardially and sacrificed. The perfusion will be done with paraformaldehyde in 10-15 minutes. The brain will be removed from the skull and prepared for histological assessment.

Schematisch overzicht experimenten

Preparation	Electrophysiology	End of experiment	Analysis
Habituation rats	1 dag	Perfusie-fixatie	Histochemistry

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

For the electrophysiological experiments the rats will be anesthetized with urethane 1,5 g/kg L.G (i.p). This experiment is a terminal experiment, in which the effects of the anesthetic on the neuronal physiology should be minimal, because this may change the electrophysiological firing properties of the neurons. For this reason we choose to use urethane, from which is known that it has the least effect in the brain physiology.

9b. Pijnbestrijding

In the clinical situation electrodes are implanted under local anesthesia. Patients rarely report any pain and there is no need for additional analgetics. In animals we perform the surgery under general anesthesia and inject lidocain on the potential painful areas.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

At the end of the experiment animals are still under deep anesthesia (urethane) and will be perfused with formaldehyde (DEC 2008-015, 2007-184, 2007-028). If the animal becomes severely ill during the experiment or suffers significantly due to the experiment or due to another cause (tumor, infection, etc...), than we will euthanize the animal using a CO₂/O₂ gas chamber. If we doubt on the severity of the suffering or the possibility exist to treat the cause, than a CPV-vet (Art. 14) will be consulted.

10a. Ongerief

The electrophysiological experiment will cause suffering due to the intraperitoneal injection of urethane. (1).

10b. Welzijnsevaluatie

In earlier experiments we also performed electrophysiological measurements. We expect that the wellbeing of the animals will be equal to earlier experiments. We will also assess the wellbeing daily by a diary and monitor the weight and the behavior.

11. Verzorging en huisvesting

Animals will be housed in pairs. There is no reason to house animals individually. Rats have free access to water and food.

12. Deskundigheid

Experiments will be performed by researchers who have broad experience in electrophysiology. The involved researchers have allowance according to the art. 9. The same kind of experiments have been performed by the VO and VVO in collaboration with experts (1) on electrophysiology, basal ganglia and the 5-HT system.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

- Stereotactische operatie SOP
- Electrofysiologische recordings SOP
- Perfusie SOP
- Urethaan SOP

13. Relevante literatuur

- Alonso, J., et al., 2004. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 21-7.
- Bhagwagar, Z., et al., 2002. State and trait abnormalities in serotonin function in major depression. *Br J Psychiatry.* 180, 24-8.
- Booij, L., et al., 2006. Tryptophan depletion affects heart rate variability and impulsivity in remitted depressed patients with a history of suicidal ideation. *Biol Psychiatry.* 60, 507-14.
- Dougherty, D. D., et al., 2003. Cerebral metabolic correlates as potential predictors of response to anterior cingulotomy for treatment of major depression. *J Neurosurg.* 99, 1010-7.
- Fava, M., 2003. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry.* 53, 649-59.
- Gabbott, P. L., et al., 2003. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res.* 993, 59-71.
- Groenewegen, H. J., et al., 1990. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Prog Brain Res.* 85, 95-116; discussion 116-8.
- Hamani, C., et al., The subcallosal cingulate gyrus in the context of major depression. *Biol Psychiatry.* 69, 301-8.
- Hamani, C., Nobrega, J. N., Deep brain stimulation in clinical trials and animal models of depression. *Eur J Neurosci.* 32, 1109-17.

- Haznedar, M. M., et al., 2004. Cingulate gyrus volume and metabolism in the schizophrenia spectrum. *Schizophr Res.* 71, 249-62.
- Kessler, R. C., et al., 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama.* 289, 3095-105.
- Kuipers, S. D., et al., 2006. Unique patterns of FOS, phospho-CREB and BrdU immunoreactivity in the female rat brain following chronic stress and citalopram treatment. *Neuropharmacology.* 50, 428-40.
- Mann, J. J., 2003. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 4, 819-28.
- Mayberg, H. S., et al., 2000. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry.* 48, 830-43.
- Mayberg, H. S., et al., 1999. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry.* 156, 675-82.
- Mayberg, H. S., et al., 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron.* 45, 651-60.
- Mottaghy, F. M., et al., 2002. Correlation of cerebral blood flow and treatment effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in depressed patients. *Psychiatry Res.* 115, 1-14.
- Nobler, M. S., et al., 2001. Decreased regional brain metabolism after ect. *Am J Psychiatry.* 158, 305-8.
- Organization, W. H., 2001. Chapter 2: Burden of Mental Health and Behavioral Disorders. WHO report 2001: Mental Health, New Understanding, New Hope.
- Parr-Brownlie, L. C., et al., 2007. Dopamine lesion-induced changes in subthalamic nucleus activity are not associated with alterations in firing rate or pattern in layer V neurons of the anterior cingulate cortex in anesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 26, 1925-39.
- Perlmutter, J. S., Mink, J. W., 2006. Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci.* 29, 229-57.
- Peyron, C., et al., 1998. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience.* 82, 443-68.
- Ressler, K. J., Mayberg, H. S., 2007. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci.* 10, 1116-1124.
- Sartorius, A., et al., Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol Psychiatry.* 67, e9-e11.
- Schiff, N. D., et al., 2007. Behavioural improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury. *Nature.* 448, 600-3.
- Schlaepfer, T. E., et al., 2007. Deep Brain Stimulation to Reward Circuitry Alleviates Anhedonia in Refractory Major Depression. *Neuropsychopharmacology.*
- Slattery, D. A., et al., 2005. Comparison of alterations in c-fos and Egr-1 (zif268) expression throughout the rat brain following acute administration of different classes of antidepressant compounds. *Neuropsychopharmacology.* 30, 1278-87.
- Smith, K. A., et al., 1997. Relapse of depression after rapid depletion of tryptophan. *Lancet.* 349, 915-9.
- Takagishi, M., Chiba, T., 1991. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res.* 566, 26-39.
- Temel, Y., et al., 2007. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Wichmann, T., Delong, M. R., 2006. Deep brain stimulation for neurologic and neuropsychiatric disorders. *Neuron.* 52, 197-204.
- Wrase, J., et al., 2006. Serotonergic dysfunction: brain imaging and behavioral correlates. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 6, 53-61.

SOP perfusie

19 november 2007

Te gebruiken oplossingen

- Tyrode
- 4% Paraformaldehyde in fosfaatbuffer 0.1M

De rat is reeds in diepe anesthesia (urethaan)

- o Geen reactie op pijnprikkel.

- Bij adequate anesthesie wordt de rat geïnstalleerd op de perfusie opstelling.
- De buikwand wordt geopend.
- Het diafragma wordt geopend en het hart wordt gecanuleerd in de linkerventrikel.

Vervolgens wordt gedurende 3-4 minuten gespoeld met 150ml Tyrode om het bloed te vervangen en de kleine vaten te dilateren. Daarna wordt overgestapt naar 4% paraformaldehyde, minimaal 600ml. De hele procedure duurt 12-15 minuten.

- De canule wordt geplaatst in de linkerventrikel.
 - o Start perfusie met Tyrode.
 - o Rechter atrium wordt geopend.
 - o Let op adequate verbleking van de lever en longen.
- Na perfusie met Tyrode, start perfusie met 4% Paraformaldehyde.
 - o Let op gele verkleuring van extremiteiten en ingewanden.
- 4% Paraformaldehyde perfusie laten lopen.
- Einde Perfusie.
- Brein collectie
 - o Decapitatie
 - o Schedel openen voor brein collectie.
 - o Brein in 4% paraformaldehyde voor post fixatie gedurende 2 uur.
 - o Gevolgd door sucrose 10%, 20% en 30% over de volgende dagen voor invriezen.

Standard Operating Procedure: Stereotactische operatie / Electrofysiologische recordings

Gebaseerd op SOP- 1 (versie 10, 19 Oktober 2007,

...)

Inleiding

Indien een onderzoeksvraagstelling verlangt dat een gedefinieerde kern in de rattenhersenen chemisch of farmacologisch wordt geprikkeld, of dat er een afleiding van hersenpotentialen wordt gemeten, kan dit worden gedaan met behulp van stereotactische procedures. De rattenhersenen zijn in kaart gebracht (e.g., Paxinos & Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press: Sydney, 1986). Nadat de kop van de rat in de gewenste positie in de stereotaxter 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 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 stereotaxter ('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 2 (gering tot matig, een terminaal experiment onder narcose).

NB. Alle genoemde procedures zijn beschreven voor de rat, maar gelden uiteraard ook voor de muis.

Anaesthesie en analgesie bij operatie

De stereotactische operatie wordt onder algehele narcose uitgevoerd. Om de rat onder narcose te krijgen wordt ze een injectie gegeven van urethaan (1,5 g/kg, i.p.). Een eenmalige injectie zal voldoende zijn om de rat gedurende een periode van uren onder narcose te houden. Voordat de rat in de stereotaxter gefixeerd wordt, dient de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen te zijn. 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 pijnprikkels). Aangezien het periost wordt verwijderd op de schedel, zal tevens lokaal lidocaine op de wond worden toegediend.

Apparaat en procedures

De haren op de hoofdhuid worden afgeschoren en verwijderd. Daarna wordt de rat in de stereotaxter gezet. Met behulp van twee stompe oorpennen, die in de gehoorgang van de rat gebracht worden, en een bekklem voor de snijtanden, wordt de kop van de 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 gedesinfecteerd in alcohol. De huid wordt zodanig gefixeerd dat de schedel goed bereikbaar is. Daarna wordt de schedel schoon en droog gemaakt met steriel 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 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.

Plaatsen van elektrodes

Middels de stereotactische operatie kunnen de registratie (micro)elektrodes, (glas)pipetten geleidelijk in de hersenen worden geplaatst, die het mogelijk maken de hersenactiviteit te meten (i.e., single cell / EEG). De (micro)elektrodes dienen op een van tevoren bepaalde plaats in het brein te worden gebracht. De (micro)elektrodes worden verbonden met het recording systeem (AlphaLab Pro, AlphaOmega) voor online visualisatie van het recordingsignaal (single cell recording, local field potential, EEG). Data wordt opgeslagen op een personal computer voor latere offline data-analyse.

Standaard Operating Procedure

Gebruik van Urethaan

FHML_0002

(o-Ethyl carbamaat)

Een algemene SOP die van toepassing is voor het gebruik van urethaan als anaestheticum in terminale experimenten bij proefdieren.

Naam laboratorium	NVT
Ruimte nummer	NVT
Instituut/Afdeling/vakgroep	NVT
Naam verantwoordelijk onderzoeker	NVT
Onderwerp	De SOP beschrijft de veiligheidsprocedures voor het gebruik van Urethaan als anaestheticum bij knaagdieren.
Laatste Revisie datum	April 2009
Opgesteld door RHVK	

Inleiding

Voor het gebruik van chemische stoffen in het bijzonder CMR stoffen is het interne beleid dat als onderdeel van de DEC procedure op basis van de gegevens die door de onderzoeker worden vermeld in aan het werkprotocol gehechte bijlage B: "werken met toxische stoffen", een toestemming onder voorwaarden vereist is.

Urethaan wordt veelvuldig gebruikt als 'one-shot' anaestheticum. Om bureaucrativering van het instrument "toestemming onder voorwaarden", te voorkomen in het toegestaan om Urethaan als anaestheticum toe te passen als verwezen wordt naar deze SOP.

Echter, iedere afwijking van deze vastgestelde SOP moet worden beschreven in werkprotocol bijlage B, toxische stoffen werken met CRM stoffen en hierop is onverkort een toestemming onder voorwaarden van toepassing. **Urethaan** wordt alleen of in combinatie met andere stoffen gebruikt om proefdieren te verdoven. Urethaan staat er om bekend dat het een langdurige stabiele anesthesie met minimale fysiologische veranderingen te weeg brengt.

Urethaan is een bewezen carcinogeen bij ratten en muizen en heeft mutagene eigenschappen.

Urethaan is een carcinogeen en mag alleen gebruikt worden met speciale rechtvaardiging voor het gebruik en alleen in terminale (acute) procedures

Fysische eigenschappen

Urethaan (CAS 51-79-6) komt voor als kleurloze kristallen of korrelig poeder en is weinig oplosbaar in olijfolie, oplosbaar in water, ether, glycerol en chloroform. Bij 25°C, is 1gr urethaan oplosbaar in 0,5gr water. Bij kamertemperatuur is Urethaan vluchtig en bij 103°C gaat Urethaan over in gasfase; toxische gassen en stikstofoxides. Urethaan is bijna reukloos. Er is geen geurdrempel voor Urethaan vastgesteld.

Gezondheidsrisico's – Toxiciteit

Urethaan is door de Europese Unie als categorie 2 carcinogeen geclassificeerd. **Urethaan** heeft carcinogene eigenschappen in ratten en muizen en heeft mutageen eigenschappen in muizen. Humane data zijn niet voorhanden. Urethaan is in vivo en in vitro genotoxisch. Urethaan is carcinogeen in muizen, raten en hamsters.

Urethaan heeft een **huidnotatie** en wordt snel door de huid opgenomen. Urethaan heeft effecten op meerdere organen, onderdrukt de vorming van bloedcellen, passeert de placenta, induceert de vorming van tumoren in foetussen in utero blootgesteld en initieert preneoplastische veranderingen in de huid.

De publieke gezondheidkundige grenswaarde is in Nederland vastgesteld op 0,002mg/m³ TGG-8u.

Zwangere vrouwen mogen niet met urethaan werken, dienen elk contact (direct en indirect te vermijden).

De mogelijke opname routes zijn:

- longen (inademing van aerosolen, gassen),
- oraal (hand-mond contact)
- huidcontact (direct contact, besmette oppervlakten).

Bij het gebruik van urethaan als anaestheticum dient men daarom de volgende maatregelen te nemen, met specifieke aandacht voor huidcontact om het risico van blootstelling te minimaliseren:

Voorzorgsmaatregelen, persoonlijke beschermingsmiddelen.

- Een veiligheidsbril of gelaatsscherm moet gedragen worden als er mogelijk contact mogelijk is met urethaan (bijv. door spatten, dampen). Persoonlijke bescherming door een veiligheidsbril is altijd nodig bij het werken met urethaan. Een normale bril zonder zijkapjes is NIET afdoende.

Het dragen van contactlenzen bij het werken met urethaan is niet toegestaan

- Veiligheidsdouche en oogdouches. In de onmiddellijke nabijheid van de werkplek dient een er een nooddouche en oogdouches beschikbaar te zijn. Oogspoelstations (flessen) zijn niet toegestaan.
- Een lab-jas, gesloten schoenen en een lange broek moet gedragen worden als men urethaan gebruikt. Beschermende kleding dient gebruikt te worden om huidcontact met urethaan te voorkomen.
- Bij het hanteren van urethaan maar ook van proefdieren die verdoofd zijn met urethaan, en hierbij mogelijk contact met bloed, serum en urine¹, dienen handschoenen gedragen te worden. Nitril wegwerphandschoenen (NitraTex®) of met verlengd manchet (NitraTex® EP) zijn hiervoor geschikt.

Speciale maatregelen

- Als Urethaan in kristallijn of poedervorm wordt gebruikt en/of wordt opgelost dient men een veiligheidsbril en handschoenen te dragen.
- Het contact met kristallijn of poedervormig urethaan dient voorkomen te worden. Om inademing van de vluchtige stof te voorkomen is het gebruik van urethaan **als poeder** (inwegen en/of andere handelingen) en/of bij het oplossen/verwarmen alleen toegestaan als de handelingen worden uitgevoerd in een **biohazardkast type II B**.
- Injecteren van proefdieren gebeurt bij voorkeur in een zuurkast. Indien dit niet mogelijk is dient om aerosolvorming te voorkomen de naald tijdens het injecteren met een tissue afgedekt te worden. (tissue behandelen als gecontamineerd)

¹ Als referentie. In 2 uur tijd wordt in de muis Urethaan geklaard indien Urethaan wordt opgelost in water. Dit betekent dat er snel metaboliëten worden gevormd. Urethaan metaboliëten zijn epoxides die het DNA kunnen aantasten. M.a.w. men moet tijdens het experiment oppassen dat men niet wordt blootgesteld aan urine (druppels).

- o Plaats nooit de beschermhuls na gebruik terug over de naald (niet recappen), of gebruik veilige naaldsystemen. Dit om het risico op een prikaccident te verkleinen.

Speciale procedures en bewaar condities

- o Open houders met urethaan zijn verboden.
- o Eenmaal opgelost dient urethaan in een gesealde fles (infuusfles) te worden bewaard. Dit voorkomt het vrijkomen in de lucht (vervluchtigen), morsen en het door een incident verontreinigen van de werkomgeving.
- o Indien er grotere hoeveelheden kunnen vrijkomen (< 300 ml) dient een absorptiemiddel aanwezig te zijn in het laboratoria. (type nog vast te stellen bijv.: Spill X-S -op bases van koolstof)

Afvalverwijdering

- o Teveel aan urethaan, in gesealde fles (zie hierboven) en alle vast afval (incl. dierlijke bijproducten) gecontamineerd met urethaan dient afgevoerd te worden in de blauwe WIVA vaten (als zogenoemd ziekenhuisafval)
- o Karkassen worden op de hiervoor van toepassing zijn wijze aangeboden aan het CPV (neem hiervoor contact op met de stable manager.
- o Werkplek wordt na gebruik afgenomen met water. Schoonmaak middelen worden als gecontamineerd materiaal behandeld.

Calamiteit: wat te doen? Noodprocedures

- o Als een spil groter is dan 300ml dient de werkplek verlaten te worden. Bel en informeer de bedrijfshulpverlening (BHV) betreffende het voorval en om welke stof het gaat. Volg de instructies van de BHV.
- o Bij een contact met de huid, ogen of andere slijmvliezen, spoel de gecontamineerde plek met veel water.



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 : MQ- 160-11

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effect of medial prefrontal cortex stimulation on neuronal firing activity*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- GGO is op dit protocol niet van toepassing, daarom kan de GGO medewerker verwijderd worden van het voorblad.
- De DEC verzoekt de aanvraag zonder track changes aan te leveren.
- De code voor pijnbestrijding op het voorblad moet code 01 zijn.
- Bij punt 9a verzoekt de DEC de zin " If necessary sedation, enzovoort" te verwijderen.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC het woord "avarege" aan te passen en in overeenstemming te brengen met de mate van ongerief op het voorblad.

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 **2011-039**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Aan:

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
07-04-2011

Project: Effect of medial prefrontal cortex stimulation on neuronal firing activity.

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-039
Diersoort: rat
Aantal dieren: 13
Einddatum: 31-03-2015

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.

Dr. R. Hoenderken
Voorzitter DEC-UM

Dr. S. Heeneman
Vice-Voorzitter DEC-UM



