



Transport van Ratten, effecten van een Black Box

Janneke Arts

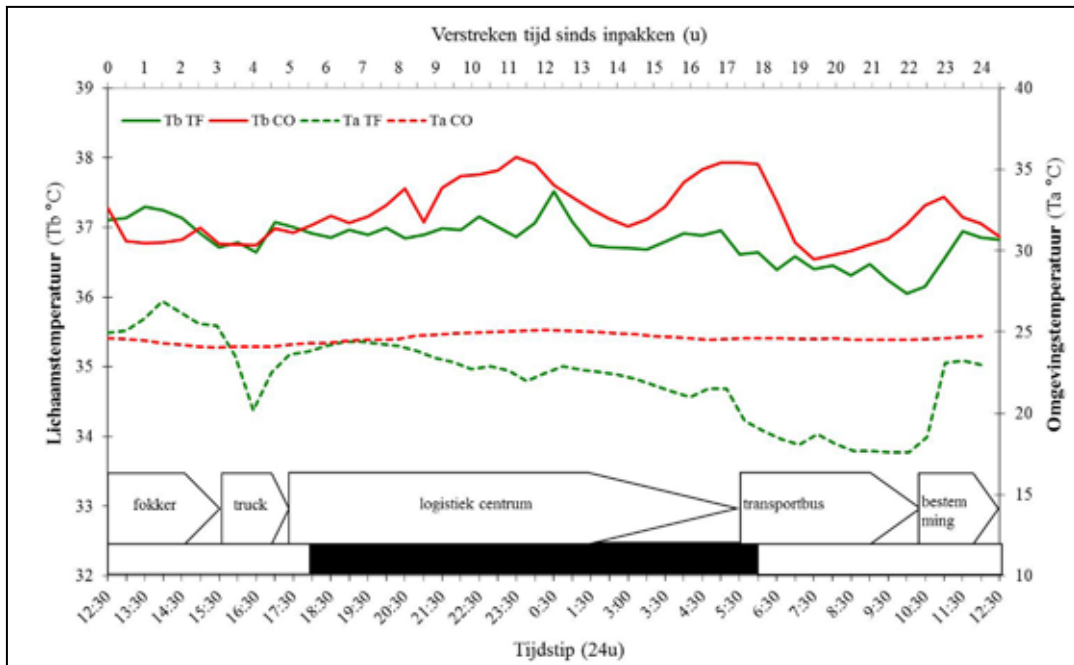
Janneke Arts: janneke.arts@envigo.com

Waarom onderzoek naar transport van ratten?

Proefdierkunde is een multidisciplinaire wetenschap die bijdraagt aan het humane gebruik en verzorging van proefdieren en de kwaliteit van dierexperimenten. Dierverzorgers, biotechnici, onderzoekers en wetgevers streven continu naar het verbeteren van het welzijn van dieren die voor onderzoek gebruikt worden. Transport van kleine knaagdieren voor onderzoek (muizen en ratten) heeft tot dusver beneden de radar van hun kritische blik kunnen blijven. Transport heeft echter niet alleen een direct effect op het welzijn van de dieren, de effecten van transport op onderzoeksresultaten kunnen ook leiden tot verkeerde conclusies.

De dagelijkse routinematige handelingen met kleine proefdieren omvatten vele stressoren die een tijdelijke afwijking van de (fysiologische) homeostase van het dier kunnen veroorzaken. Stressoren beïnvloeden vele verschillende processen in het lichaam. In een stressvolle situatie zal een dier op een andere manier op een stimulus reageren dan het zou doen in een stressvrije situatie. Op deze manier kan een stress reactie van een dier de onderzoeksresultaten beïnvloeden. Om betrouwbare data te verkrijgen van getransporteerde dieren, kan de transportstress verminderd worden door het implementeren van een acclimatisatieperiode tussen het transport en de aanvang van het onderzoek. Degenen die betrokken zijn bij dierexperimenteel onderzoek zijn zich ervan bewust dat dieren zo'n acclimatisatieperiode nodig hebben na aankomst op hun faciliteit. Echter, de duur van deze acclimatisatieperiode is zelden gebaseerd op wetenschappelijk gefundeerd ('evidence based') onderzoek, ook al zijn de experts helder in hun waarschuwingen betreffende de effecten van transport op onderzoeksresultaten.

De auteur heeft de afgelopen jaren onderzoek gedaan naar de effecten van transport op gedrag en fysiologie van ratten. De resultaten van dit onderzoek zijn deels gepubliceerd (1, 2, 3) en gebundeld in een proefschrift (4). Dit artikel is hier een samenvatting van. De onderzoeken zijn dusdanig ontworpen dat deze de effecten van transport, en de duur van deze effecten, meten in Wistar Unilever (HsdCpb:WU) ratten, een veelgebruikte uitteelt stam voor algemene onder- »



Afbeelding 1. Lichaamstemperatuur (Tb °C) en omgevingstemperatuur (Ta °C) in getransporteerde (TF) en controle (CO) Wistar ratten tijdens transport, met de verschillende fases van transport. De zwart-witte balk geeft de lichtperiode aan (zwart is donker, wit is licht)



Afbeelding 2. Voorbeeld van een transportdoos voor kleine proefdieren

zoeksdoelinden. De resultaten zouden kunnen helpen in het optimaliseren van het transport en acclimatisatie proces, om hiermee het welzijn van de dieren en de validiteit van de onderzoeksresultaten te verbeteren. De gekozen opzet van het onderzoek was dusdanig dat, door de dagelijkse praktijk van proefdiertransport te imiteren, vertaling naar andere onderzoeksvelden mogelijk is. Zoals te zien in het voorbeeld in afb. 1, omvat transport van proefdieren verschillende fases, welke voor elke situatie weer verschillend kunnen zijn. Afb. 2 laat een voorbeeld zien van een transportdoos, zoals gebruikt in dit onderzoek.

Wat is er onderzocht en welke resultaten zijn er gevonden?

Het onderzoek is gestart met een eerste verkennend onderzoek naar de effecten van transport op mannelijke Wistar ratten. Om de stress die een dier tijdens transport ervaart te meten, is hier gekozen voor een multidimensionaal perspectief. Door middel van telemetrie zijn er fysiologische metingen gedaan op hartslag, bloeddruk en (bewegings-)activiteit. Door middel van het observeren van de dieren in hun thuishok zijn de effecten op gedrag geanalyseerd. Gescoorde gedragingen waren: activiteit, sociale interacties en zelf-grooming (vachtverzorging d.m.v. poetsen, likken). Ook zijn er op regelmatige basis bloedmonsters genomen om de effecten te meten op plasma corticosteron en creatine kinase. Gedurende het gehele onderzoek zijn de dieren wekelijks gewogen. Om de effecten van enkel inpakken te meten, bevatte dit onderzoek een controle groep welke wel ingepakt werd, maar niet getransporteerd.

In het algemeen had transport significante effecten op fysiologische en gedragsparameters in deze mannelijke ratten. We vonden dat hartslag, bloeddruk, activiteit, plasma corticosteron en bepaalde gedragsparameters niet terug kwamen naar het gemeten basaal niveau vóór transport. Stabilisatie lijkt op een allostatisch (nieuw verkregen) niveau te gebeuren in plaats van op een homeostatisch niveau. Gebaseerd op stabilisatie van hartslag en bloeddruk kan men concluderen dat een week acclimatiseren voldoende lijkt te zijn voor de dieren om te herstellen. Echter, plasma corticosteron en (sociaal) gedrag geven in dit experiment geen blijk van herstel gedurende de drie weken acclimatisatietijd.

De getransporteerde dieren die gebruikt zijn in dit experiment zijn na afloop hergebruikt in een pilot onderzoek naar de effecten van intern transport gecombineerd met het omdraaien van lichtregime.

Verschillen tussen man en vrouw

Vervolgens is gekeken naar mogelijke sekseverschillen in effecten van transport. De meetperiode na transport werd hierbij verlengd naar zeven weken om het inzicht in de duur van de transporteffecten te vergroten, met name om te onderzoeken of corticosteron en gedrag volledige stabilisatie zouden laten zien op de langere termijn. We hebben de fysiologische en gedragsparameters 'voor' versus 'na' extern én intern transport vergeleken, evenals getransporteerde dieren versus niet-getransporteerde Wistar ratten. De impact van zowel extern als intern transport op lichaamsgewicht, plasma corticosteron, hartslag, bloeddruk en bewegingsactiviteit is bestudeerd in zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, waarbij rekening gehouden werd met de sekseverschillen in stressrespons.

De resultaten van dit experiment tonen verschillen aan tussen de twee seksen en tussen de lichtfasen. Extern transport veroorzaakte een afname in lichaamsgewicht en een toename in activiteit in beide seksen. Verder had transport een tegenovergesteld effect op hartslag in de twee seksen; vrouwelijke ratten lieten na transport een stijging in hartslag zien, mannelijke ratten lieten na transport een daling zien in hartslag (afb. 3). Vrouwelijke ratten lieten bij het uitpakken een acute daling in plasma corticosteron zien, voordat deze ging stijgen. Plasma corticosteron was een week na transport in beide seksen gestegen. Vrouwelijke ratten lieten een grote variabiliteit in plasma corticosteron zien, waarschijnlijk veroorzaakt door de oestrus cyclus. Er zijn geen stabiele plasma corticosteron niveaus gemeten gedurende dit onderzoek. Intern transport had geen effect op lichaamsgewicht, maar had in beide seksen wel een klein effect op hartslag en activiteit gedurende twee dagen. Temperatuur registratie in de transportdozen liet tijdens transport grote variaties zien in temperatuur en luchtvochtigheid.

Dit onderzoek heeft aangetoond dat acclimatisatie na transport sekse specifiek is en dat onderzoekers rekening moeten houden met de sekse bij het bepalen van de acclimatisatieperiode. De resultaten van dit experiment duiden op een allostatische acclimatisatie na extern transport van acht dagen in mannelijke ratten en twee weken in vrouwelijke dieren en op twee dagen voor beide seksen na intern transport. »

Providing Quality Purpose Bred Animals for Biomedical Research



 *Beagles now available in the UK*



BIORESOURCES

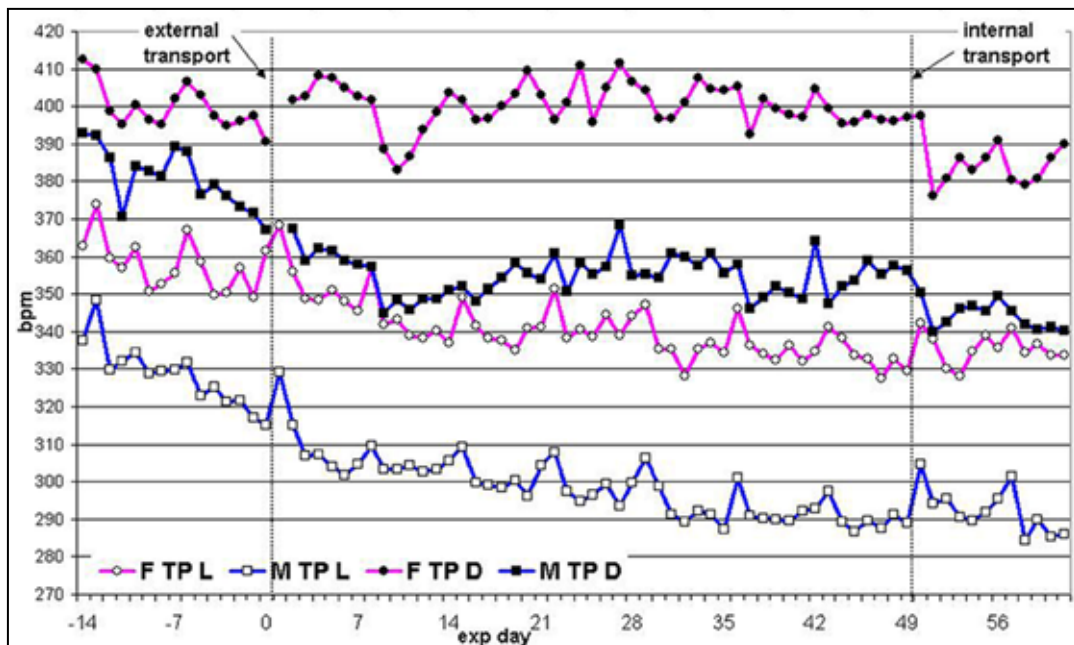


- Beagle Production in the United States, Europe and China
- Comprehensive Socialization and Enrichment Programs
- Dedicated to Flexible, Personalized Customer Service
- ISO-9001 Certified Quality Systems

 North America
+1 315.587.2295
infous@marshallbio.com

 Europe
+33 4 72 56 98 60
infoeu@marshallbio.com

 Asia
+86 10 84923662
infoch@marshallbio.com



Afbeelding 3. Hartslag frequentie (bpm) in getransporteerde mannelijke (M) en vrouwelijke (F) ratten, gedurende de licht (L) en donker (D) fase.

Hittestress

Na het identificeren van de effecten van transport op verschillende parameters, is er gekeken naar een mogelijke oorzaak van deze effecten, namelijk (omgevings-)temperatuur. Hittestress is eerder in literatuur genoemd als een van de belangrijkste aandachtspunten tijdens transport van dieren. Het hier beschreven experiment was gericht op het meten van omgevings- en lichaamstemperatuur, plasma corticosteron en glucose, lichaamsgewicht, gedrag en water en voer inname, vóór, tijdens en na transport in zowel mannelijke als vrouwelijke Wistar ratten.

Na transport bleek de voer inname gedurende twee dagen verhoogd in mannelijke ratten en gedurende drie dagen in vrouwelijke ratten. Water inname was verhoogd gedurende een dag in vrouwelijke ratten. Het plasma corticosteron niveau in de vrouwelijke dieren was verlaagd bij aankomst, maar verder zijn er geen effecten gevonden in plasma corticosteron vanaf een week na transport. Mogelijk is dit uitblijven van effect veroorzaakt door de beloning die de dieren ontvingen wanneer ze gehanteerd werden. Er werden geen effecten op plasma glucose waarden gevonden. Vrouwelijke dieren lieten meer zelf-grooming en minder sociaal gedrag zien direct na transport. In beide seksen was activiteit verhoogd en was sociaal gedrag verlaagd vergeleken met het basaal niveau (vóór transport), vanaf één week na transport. Respectievelijk een week na transport in de mannelijke ratten en drie weken na transport in de vrouwelijke ratten bleken alle gedragsparameters allostatisch geacclimatiseerd.

Het normaliter gevonden verschil in (diepe) lichaamstemperatuur tussen de licht en donker fase van de lichtcyclus, bleek niet aanwezig te zijn in de getransporteerde dieren. Er werd een sterke correlatie gevonden tussen lichaamstemperatuur en omgevingstemperatuur (zie ook afb. 1). Ondanks de klimaatcontrole in alle ruimtes en voertuigen liep de temperatuur in de transportdozen op tot 28,5 °C. Ondanks dat hyperthermie (oververhitting) werd verwacht door de combinatie van stress en verhoogde omgevingstemperatuur, is dit fenomeen niet waargenomen tijdens of na transport. Echter, de resultaten laten wel zien dat omgevingstemperatuur de lichaamstemperatuur van ratten beïnvloedt en dat deze daarom zeker gereguleerd dient te worden. Mannelijk »

ratten hadden in dit onderzoek een week na transport nodig om te acclimatiseren, vrouwelijke ratten hadden twee weken nodig.

Jet-lag

Ook is een verkennend (pilot) experiment gedaan naar de effecten van het omdraaien van het lichtregime met dieren die voor een ander experiment al voorzien waren van een telemetrie zender. Dit onderzoek evalueert of het de vaak gebruikte 'één-dag-per-verschoven-uur'-strategie voldoende hersteltijd biedt voor de dieren.

Na een intern transport naar een ander gebouw werden de dieren acht dagen geacclimatisiseerd. Vervolgens werd het lichtregime omgedraaid naar (wit) licht van 19:00 tot 7:00; een verschuiving van twaalf uur. Tijdens dit onderzoek werd bewegingsactiviteit, hartslag en bloeddruk gemeten na het interne transport en vóór en na de omdraaiing van het lichtregime.

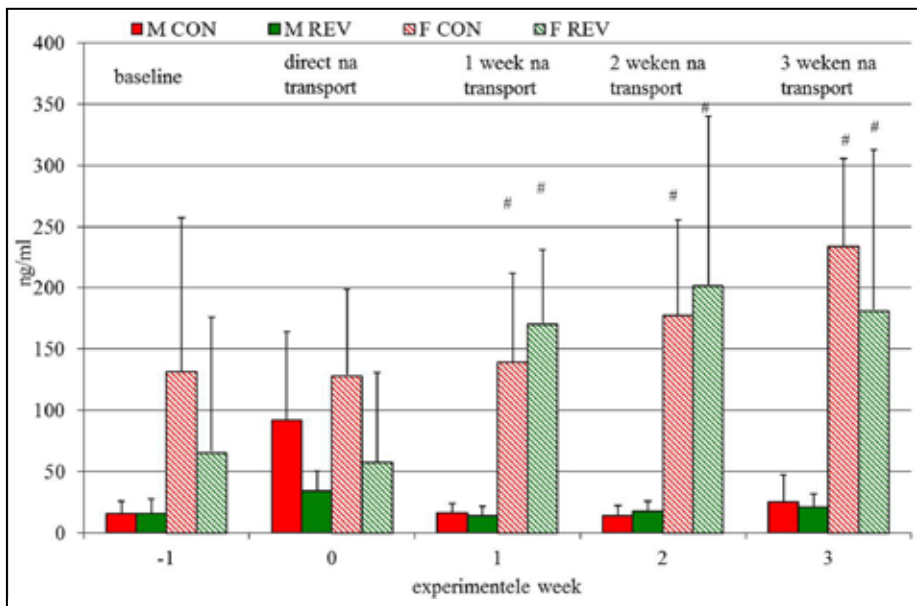
Uit de resultaten blijkt dat de fysiologische parameters hartslag, bloeddruk en activiteit respectievelijk negen, tien en acht dagen nodig hadden om te stabiliseren en terug te keren naar het basaal niveau (vóór omdraaiing) in deze gecombineerde procedure van intern transport en omdraaiing van lichtregime. Het ontbreken van een significant verschil in bloeddruk tussen de licht- en donkerfase tijdens de basaal metingen vóór omdraaiing van lichtregime kan er op wijzen dat acht dagen hersteltijd na intern transport onvoldoende was om geheel te herstellen. De manier van intern transport, waarbij gebruik is gemaakt van transportdozen, kan hierin mogelijk meer vergelijkbaar zijn geweest met een extern transport dan met een regulier intern transport.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat mannelijke Wistar ratten minimaal tien dagen acclimatisatietijd nodig hebben na het omdraaien van lichtregime voordat ze onderwerp van studie worden in een onderzoek naar vergelijkbare parameters. Ondanks dat de dieren iets ouder waren dan wat in de dagelijkse praktijk gebruikt wordt, achten wij deze resultaten waardevol voor de visualisatie van het interne fysiologische proces na het omdraaien van het lichtregime.

Niet storen tijdens de slaap!

Tenslotte is onderzocht welk effect het omdraaien van lichtregime op de acclimatisatie van fysiologische en gedragsparameters na extern transport had. In tegenstelling tot hun menselijke onderzoekers zijn knaagdieren in onderzoek nachtdieren, actief gedurende de nacht en in rust tijdens kantooruren. Veel onderzoekers kiezen er daarom voor om in gedragsstudies de licht en donkerfase in de dierkamer om te draaien. Dit zorgt ervoor dat wanneer de onderzoekers aanwezig zijn, de dieren in hun nacht (donkerfase) en dus actieve fase zitten. De combinatie van transport en het omdraaien van het lichtregime zorgt mogelijk voor een gewijzigd herstel in kleine knaagdieren in proefdieronderzoek en kan een aanpassing vereisen in de huidige gebruikte acclimatisatieperiodes. In dit onderzoek hebben we mannelijke en vrouwelijke Wistar ratten gebruikt, waarin we lichaamsgewicht, plasma corticosteron en gedrag in de thuishok gemeten hebben.

Transport veroorzaakte een afname in lichaamsgewicht van 3,0% in mannelijke en 3,2% in vrouwelijke ratten, gemeten direct na het uitpakken bij aankomst. Groei (in lichaamsgewicht) herstelde zich in alle groepen binnen een dag. Mannelijke controle ratten (geen omdraaiing in lichtregime) lieten na transport een lager lichaamsgewicht zien dan de mannelijke ratten in de experimentele (omgedraaid lichtregime) groep. Er is geen significant verschil gevonden in lichaamsgewicht met betrekking tot lichtregime of transport in de mannelijke ratten. Vrouwelijke controle ratten lieten een verhoogd plasma corticosteron niveau zien tot aan het eind van het onderzoek. Vrouwelijke ratten in de experimentele groep lieten een verhoogd plasma corticosteron niveau zien gedurende de eerste twee weken na transport, waarna tijdens de derde week een daling intrad (afb. 4). Controle ratten van beide seksen lieten minder actief gedrag zien na transport dan de experimentele ratten. De controle ratten lieten ook meer rustgedrag zien in de laatste weken van het onderzoek. Transport verhoogde de hoeveelheid eetgedrag in alle groepen vergeleken met het basaal niveau vóór transport. De resultaten van de gedragsobservaties laten zien dat de ratten die onder een



Afbeelding 4. Corticosteron waarden (ng/ml ± SD) in mannelijke (M) en vrouwelijke (F), Controle (CON) en omgekeerd dag-nacht ritme (REV) Wistar ratten, # geeft significant verschil opzicht van baseline aan.

omgekeerd lichtregime worden gehuisvest, sneller acclimatiseren dan de controle dieren. Hierdoor kan er gesuggereerd worden dat acclimatisatie ondersteund wordt door de afwezigheid van verstoring gedurende de rustfase van de ratten onder een omgedraaid lichtregime. Echter, gebaseerd op de resultaten van dit experiment, adviseren we twee weken acclimatisatie in zowel mannelijke als vrouwelijke ratten, ongeacht het wel of niet omdraaien van het lichtregime.

Adviezen voor de praktijk

Gebaseerd op de resultaten van deze onderzoeken, geven we de volgende praktische adviezen voor het verbeteren van transport en acclimatisatie van proefdieren na transport:

Acclimatisatietijd van mannelijke en vrouwelijke ratten moet minimaal twee weken bedragen, ondanks het feit dat sommige parameters sneller stabiliseren. Het gehele dier moet zich aan kunnen passen aan de nieuwe omgeving en niet slechts een enkele parameter;

- Acclimatisatie is ook nodig na een intern transport;
- Er moet rekening gehouden worden met stam en leeftijd van de dieren tijdens transport, aangezien factoren als adolescentie en inteelt mogelijke een aanpassing van de acclimatisatietijd vragen;
- Er moeten passende acclimatisatietijden verkregen worden voor specifieke combinaties van dier (soort, stam, leeftijd) - parameter - transport procedure (voertuig, duur, afstand);
- Omgevingstemperatuur voor transportdozen met ratten zou 5°C lager moeten zijn (17°C) dan de huisvestingstemperatuur (22°C).

Voor vragen over dit onderwerp of een pdf versie van het proefschrift, neem gerust contact met Janneke op.

Referenties

- 1 Arts JWM, Kramer K, Arndt SS *et al.* (2012). *The impact of transportation on physiological and behavioral parameters in Wistar rats - implications for acclimatization periods.* ILAR Journal 53(1): E82-98
- 2 Arts JWM, Kramer K, Arndt SS *et al.* (2014). *Sex Differences in Physiological Acclimatization after Transfer in Wistar Rats.* Animals 4, 693-711
- 3 Arts JWM, Oosterhuis NR, Kramer K *et al.* (2014). *Effects of Transfer from Breeding to Research Facility on the Welfare of Rats.* Animals 4, 712-728
- 4 Arts JWM (2015). *Transportation in Laboratory Rats, Effects of a Black Box.* PhD thesis Utrecht University, ISBN 978-90-393-6495-6

«