

De muis; niet voor één gat te vangen?



Maaïke Labots & Hein A. van Lith

Divisie Dierenwelzijn & Proefdierkunde, Departement Dier in Wetenschap en Maatschappij, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Inleiding

Het oppakken van laboratoriummuizen heeft een effect op hun stress- en angstgerelateerde reacties. Ook de manier waarop het dier wordt opgepakt kan grote effecten hebben op het gedrag. In (gedrags-)onderzoek is het daarom van groot belang dat de handelingen met de dieren gestandaardiseerd zijn, zodat ieder dier dezelfde handeling ondergaat en dat de dieren gewend zijn aan de ingreep.

Er bestaan talloze gedragsopstellingen om allerlei soorten gedragingen bij proefdieren te kunnen meten. Zelfs wanneer we ons beperken tot de muis, zijn er legio gedragstesten beschikbaar (1). Toch hebben de meeste gedragsopstellingen één ding gemeen; de muis moet bij aanvang van de test in de opstelling geplaatst worden, om er na afloop weer uitgehaald te worden (met enige uitzonderingen daargelaten; bijvoorbeeld bij een gedragsopstelling waarbij het de taak van het dier is om zijn thuishooi te vinden of wanneer er metingen worden verricht in de thuishooi). Zowel het dier in de opstelling zetten als het uithalen kan een stress reactie opleveren, evengoed bij dier als mens.

Bij één gedragsopstelling geldt dit in het bijzonder, namelijk het dier uit de zogenaamde *Elevated Plus Maze* halen. Deze opstelling bestaat uit twee open en twee gesloten armen en bevindt zich op een verhoogd platform. Muizen zijn over het algemeen niet voor één gat te vangen, en zullen vrijwel altijd proberen te ontkomen aan de hand van de onderzoeker. Voornamelijk in de nauwe omgeving van de gesloten armen. Echter, er bestaat een relatief simpele, stress verminderende manier om het dier uit de opstelling te halen: door een buis als thuishooiverrijking te gebruiken. Deze buis kan na de test bij de opstelling gehouden worden zodat het dier op de geur afkomt en in de buis loopt waarna de buis met het dier erin naar de thuishooi vervoerd kan worden. Deze hanteermethode zorgt voor een minder stressvolle handeling bij het dier.

Gedragsonderzoek en de *Elevated Plus Maze* (EPM)

Een veelgebruikte gedragsopstelling om angst-gerelateerd gedrag bij knaagdieren te meten, is de zogenaamde *Elevated Maze*. Hieronder vallen o.a. de *Elevated Zero Maze*, *Elevated*

X-shaped Maze, Elevated Plus Maze en Elevated T-Maze. Van deze mazes wordt de Elevated Plus Maze, afgekort tot EPM, het meest gebruikt (2). De opstelling van de EPM bestaat uit een +-vorm met twee gesloten en twee open armen, en bevindt zich ongeveer 80-100 cm boven de grond (afb. 1A). De wanden van de gesloten armen kunnen transparant of ondoorzichtig zijn. Het principe van de EPM is gebaseerd op de observatie dat muizen hoge, open en onbeschermde gebieden vermijden (3, 4). De kwantificering van het vermijden van dergelijke gebieden wordt gezien als maat voor angstgedrag. Bovendien zijn er meerdere gedragingen te scoren, waaronder locomotie en exploratie.

Ondanks het feit dat de EPM een gevalideerde test is en veelvuldig gebruikt wordt in onderzoek naar angstgedrag, zijn er vaak uiteenlopende resultaten tussen verschillende onderzoeksgroepen (5, 6). Bij uitvoering van twee identieke experimenten op twee verschillende locaties, bleek voornamelijk exploratiegedrag in de EPM locatie afhankelijk - en dus afhankelijk van de omstandigheden van de locatie, zoals bijvoorbeeld andere diervverzorgers -te zijn (7). Hierdoor blijkt de replicerbaarheid van gedragsonderzoek erg lastig. Daarbij is ook de keuze van de muizenstam van invloed op de resultaten (8). Om deze reden wordt veel moeite gestoken in het standaardiseren en harmoniseren van experimenten: door zoveel mogelijk factoren hetzelfde te houden (de keuze van muizen(sub)stam, de darmflora, het lichtschema waarin de dieren gehuisvest worden, het gebruik van kooiverrijking, het reguleren van temperatuur en luchtvochtigheid van de dierkamers etc.) wordt getracht de onderzoeken zo identiek mogelijk te maken. Toch komen de uiteenlopende resultaten tussen de onderzoeksgroepen nog steeds voor. Een factor die invloed kan hebben op de resultaten, met name in onderzoek naar angst, is de manier van hanteren.

Zoals in de inleiding is aangegeven, kan het hanteren van een muis een aanzienlijke stressreactie opwekken bij het dier (9). Daarom is er behoefte aan een hanteermethode die zoveel mogelijk de stressreactie vermindert, zodat zoveel mogelijk het aangeboren gedrag van het dier gemeten kan worden.

Manieren van hanteren

Uit onderzoek is gebleken dat deze 'hanteerstress' invloed heeft op zowel het gedrag van de dieren als op de fysiologie (10). Voor zowel gedragsonderzoekers als onderzoekers - die geïnteresseerd zijn in bijvoorbeeld het metabolisme, bepaalde farmacologische of fysiologische processen van het dier - is het daarom erg belangrijk hoe de dieren worden gehanteerd. Aangezien er vaak onverklaarbare variaties zitten in onderzoeken uit verschillende laboratoria, is het allereerst belangrijk dat de dieren op dezelfde manier worden gehanteerd (standaardisatie en harmonisatie), en is het ten tweede van belang dat er zo min mogelijk hanteerstress optreedt.

De meest voorkomende manier van het hanteren van de muis is het vastpakken van het dier bij de staartbasis. Deze wordt dan (met ondersteuning op bijvoorbeeld de onderarm) overgezet in een nieuwe kooi (bij het verschonen) of in een gedragsofstelling. In 2010 schreven Jane Hurst en Rebecca West dat het gebruik van tunnels of een open hand leidde tot een verminderde angstrespons bij muizen in vergelijking met het vastpakken van de staartbasis (9). De methode met de open hand houdt in dat de muis met twee handen uit de kooi wordt 'geschept' en vervolgens vrij op de open hand rond mag lopen (zie filmpje over 'cup handling' op: <https://www.nc3rs.org.uk/handling-and-restraint>). De initiële reactie van de muis zal zijn om weg te springen. Echter, muizen zijn dermate te trainen dat ze na enige oefensessies vrijwillig op de hand van de onderzoeker stappen en op deze manier vervoerd kunnen worden. Deze trainingsperiode is dan ook meteen het nadeel van deze methode; het vergt enige tijd aan training en vaak willen de onderzoekers de dieren 'naïef' testen (zodat er puur wordt gekeken naar de aangeboren eigenschappen van een dier en ze niet beïnvloed zijn door eerdere ervaringen/trainingen). De alternatieve optie van hanteren met een tunnel haalt deze nadelen weg, omdat dit geen training vergt. Het principe hierachter is dat de tunnel onderdeel is van de kooiverrijking van de dieren »

in de thuis-kooi en dat de dieren op de bekende geur afkomen (zie filmpje over ‘tunnel handling’ op: <https://www.nc3rs.org.uk/handling-and-restraint>).

Zoals hierboven aangegeven, is het met name lastig om de dieren uit de EPM opstelling te halen, omdat de muis gemakkelijk naar de andere gesloten arm kan rennen (afb. 2). Ten tijde van het uitkomen van een onderzoek van Gouveia en Hurst in 2013 (10), vonden wij een soortgelijke oplossing om de dieren uit de EPM te halen. Wanneer de dieren gehuisvest werden met een plastic buis als kooiverrijking, kon deze buis gebruikt worden om de dieren uit de opstelling te halen. Door de buis op de open arm van de EPM te zetten (afb. 1B), bleek dat de muizen redelijk snel op de buis afkwamen en zelfs naar binnen stapten (afb. 3). Hierdoor kon het dier met buis en al vervoerd worden naar de thuis-kooi. Met deze methode werd ten eerste voorkomen dat het dier opgepakt wordt aan de staartbasis en ten tweede dat het dier niet achtervolgd/opgejaagd werd door de onderzoeker om het dier te pakken.

Naast onze observatie dat het dier makkelijker naar de thuis-kooi te vervoeren was na afloop van een EPM experiment, ging het onderzoek van Gouveia en Hurst (10) nog een stapje verder. Gouveia en Hurst hebben onderzocht wat het effect was van verschillende hanteermethodes op angstgedrag in de EPM (10). De muizen werden bij de staartbasis, met een tunnel uit de thuis-kooi of met een onbekende tunnel opgepakt en vervoerd. Uit dit onderzoek bleek dat dieren die vervoerd werden met beide soorten tunnels verminderd angstgedrag vertoonden vergeleken met het hanteren bij de staartbasis. Daarnaast werd duidelijk dat er ook een verschil was tussen een tunnel die als kooiverrijking werd gebruikt en een tunnel solitair bedoeld om te hanteren (en dus voor meerdere dieren werd gebruikt). Een aantal muizen die gehanteerd werden met een tunnel uit de thuis-kooi vertoonden nog minder angstgedrag vergeleken met de algemeen gebruikte tunnel. Het advies van deze onderzoekers is om de dieren te huisvesten met een tunnel in de thuis-kooi en deze bovendien te gebruiken bij het hanteren van de dieren (10). Uiteraard zijn er altijd uitzonderingen en dat vonden wij ook in ons onderzoek, want waar de meeste muizen contact met mensen schuwen, waren er ook muizen die uit zichzelf op de onderzoeker afkwamen (persoonlijkheid en karakter verschillen tussen muizen) en op deze manier makkelijk opgepakt konden worden (afb. 4).

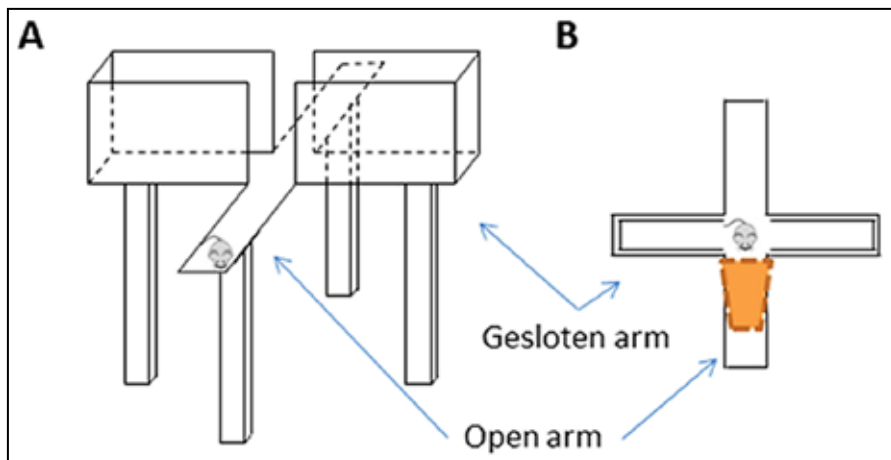
Kooiverrijking

Naast de functie van de plastic buis in de thuis-kooi om op deze manier de dieren gemakkelijk te vervoeren van een gedragsopstelling, heeft de buis zelf nog een belangrijke functie, namelijk die van kooiverrijking. Uit onderzoek is gebleken dat muizen in huisvesting zonder kooiverrijking een verminderde hersenontwikkeling hebben, en meer stereotype en angst-gerelateerd gedrag vertonen (11). Het is dus zowel ten gunste van het dier als van de onderzoeker wanneer er kooiverrijking wordt gebruikt, aangezien de onderzoeksresultaten betrouwbaarder worden wanneer de huisvesting van de dieren verbeterd wordt.

Samenvattend

Het gebruik van een tunnel/buis als kooiverrijking én als methode voor het vervoeren van muizen van en naar een gedragsopstelling is aan te raden. Dit zorgt zowel voor een verbetering van de huisvesting van de muis als voor een vermindering van hanteerstress. Dit kan bovendien leiden tot minder variatie in de onderzoeken en een gemakkelijke manier om een muis uit een gedragsopstelling te halen. Is de muis dan toch voor één gat te vangen?

Dit werk wordt opgedragen ter nagedachtenis aan prof. dr. Frauke Ohl (hoogleraar Dierenwelzijn & Proefdierkunde en voorzitter van het Utrechtse departement Dier in Wetenschap en Maatschappij), die op 28 januari jl. op te jonge leeftijd overleed. Frauke Ohl was de voorzienne promotor van Maaïke Labots, directe chef van Hein A. van Lith en bovenal een dierbare en inspirerende collega.



Afbeelding 1.
 A: Schematische afbeelding van de 'Elevated Plus Maze'; een veelgebruikte test voor angstgerelateerd gedrag in muizen.
 B: Bovenaanzicht met een oranje plastic buis op de open arm van de EPM.

Afbeelding 2.
 Bovenaanzicht van de EPM waarbij de onderzoeker de muis (aangegeven met rode pijl) uit de gesloten arm haalt.



Afbeelding 3.
 Gebruikmakend van de op de open arm geplaatste plastic buis afkomstig uit de thuishooi, loopt de muis (aangegeven met rode pijl) naar binnen en is deze met buis en al terug te plaatsen in de thuishooi. »



U kiest voor professionele desinfectie

Een compleet desinfectieprogramma

Als u niets aan het toeval wilt overlaten dan heeft VEIP desinfectants een compleet desinfectieprogramma voor u. Zeer effectief tegen bacteriën, gisten, schimmels en virussen. De producten zijn volledig biologisch afbreekbaar en conform de Europese Biocide Verordening (EG) 528/2012.

Kijk voor meer informatie op www.veip.nl



Halapur



Halamid-d



Actisan



Actisept



Acticid



Afbeelding 4.
Waar de meeste muizen menselijk contact ontlopen, zijn er altijd uitzonderingen. Deze muis (aangegeven met rode pijl) volgt de hand van de onderzoeker op de open arm, waarna deze makkelijk op te pakken is.

Foto's afbeelding 2 t/m 4:
Anne-Marie Baars.

Referenties

1. Karl T, Pabst R, von Hörsten S (2003). *Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 55: 69-83 doi: 10.1078/0940-2993-00301.
2. Pellow S, Chopin P, File SE et al. (1985). *Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-167 doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.
3. Ohl F (2005). *Animal models of anxiety*. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 35-69 doi: 10.1007/3-540-28082-0_2.
4. Lister RG (1990). *Ethologically-based animal models of anxiety disorders*. *Pharmacology & Therapeutics* 46: 321-340 doi: 10.1016/0163-7258(90)90021-S.
5. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E et al. (2002). *Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice*. *Behavioural Brain Research* 134: 49-57 doi: 10.1016/S0166-4328(01)00452-1.
6. Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). *Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29: 1193-1205 doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.
7. Wahlsten D, Bachmanov A, Finn DA et al. (2006). *Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 16364-16369 doi: 10.1073/pnas.0605342103.
8. O'Leary TP, Gunn RK, Brown RE (2013). *What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice?* *Behavior Genetics* 43: 34-50 doi: 10.1007/s10519-012-9572-8.
9. Hurst JL, West RS (2010). *Taming anxiety in laboratory mice*. *Nature Methods* 7: 825-826 doi: 10.1038/nmeth.1500.
10. Gouveia K, Hurst JL (2013). *Reducing mouse anxiety during handling: Effect of experience with handling tunnels*. *PLoS ONE* 8: e66401 doi: 10.1371/journal.pone.0066401.
11. Wolf DP, Litvin O, Morf S et al. (2004). *Laboratory animal welfare: Cage enrichment and mouse behaviour*. *Nature* 432: 821-822 doi: 10.1038/432821a.

«