

AVD 103002016482
22 MAART 2016



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Grooteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101, t.a.v. [REDACTED]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10																
Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 18 . 04 . 2016
- Einddatum 18 . 04 . 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neural synchronization and executive functions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 18 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Neural synchronization and executive functions |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

EXECUTIVE FUNCTIONS AND THEIR IMPAIRMENTS

Executive functioning refers to the ability to monitor the environment for mistakes, conflicts, or negative performance feedback, and to initiate rapid but flexible action adjustments to optimize goal-directed behavior (Botvinick et al., 2001; Ridderinkhof et al., 2004). "Executive functioning" is a fairly broad term; in our research we focus on a few specific aspects of executive functioning: response conflict, effort-based decision-making, and stimulus-reward association learning.

Impairments in these and related executive functions are disrupted in several clinical disorders including major depression and schizophrenia. Understanding the neural circuitry underlying executive functioning, and how that circuitry depends on neurochemicals such as dopamine and serotonin, may lead to a significant advance in understanding disorders of executive functioning, as well as studying the effects of treatments.

THETA OSCILLATIONS IN NEURAL CIRCUITS UNDERLYING EXECUTIVE FUNCTIONS

Executive functioning relies on a network of inter-connected brain regions, mainly including the prefrontal cortex, parietal cortex, and striatum/basal ganglia (for convenience, this collection of systems will be referred to as the "executive functioning network"). For example, lesions to the medial prefrontal cortex of rats leads to impairments in decision-making and increased impulsivity (Courtière et al., 2007; Walton et al., 2002).

Neural oscillations -- rhythmic fluctuations in the excitability of populations of neurons -- are important markers of neural activity. Theta-band (4-8 Hz) oscillations in the medial prefrontal cortex are strongly associated with executive functioning in humans (see Cohen 2014, for a review). It has been speculated that theta oscillations are used to synchronize brain activity across regions within the executive functioning network, and between this network and sensory processing areas. In other words, it is thought that theta oscillations are crucial for executive functioning, and that understanding the role of theta in executive functioning will lead to advances in understanding healthy executive functioning and impairments in executive functioning in clinical disorders. However, the precise role of theta oscillations is very difficult to study using non-invasive methods in humans. Therefore, rodent models are necessary.

Although people often associate “theta” in the rat with hippocampus and memory, other findings have shown that theta in the prefrontal cortex is independent of hippocampal theta (different frequency, different statistical characteristics, and so on) (Pignatelli et al., 2012). Indeed, there is no unitary “theta function.” In humans it has been demonstrated that theta oscillations in the occipital cortex are different from theta oscillations in the medial prefrontal cortex, which are different from theta oscillations in the hippocampus (Cohen, 2014). In this research, we will focus on theta in the medial prefrontal cortex of rats, and how this theta is used to synchronize neural activity with other brain regions.

THE ROLES OF DOPAMINE AND SEROTONIN IN NEURAL CIRCUITS UNDERLYING EXECUTIVE FUNCTIONS

Executive functioning is modulated by a variety of neurochemicals, with dopamine and serotonin being the most important. Indeed, small doses of dopamine medication (cabergoline, LDopa, etc) change people's stimulus-reward association learning abilities and accompanying functional connectivity between prefrontal cortex and striatum (Cohen et. al., 2007). What is the function of dopamine in executive functioning? There are several prominent ideas, including providing a prediction error signal that guides learning, helping the brain ignore noise to focus on signal, and enhancing synaptic plasticity (thought to be a mechanism for learning and forming associations). We believe that dopamine plays a crucial role by facilitating synchronization in the executive functioning circuit, by boosting plasticity when inter-regional synchronization is present. The roles of dopamine in modulating neural activity in the executive functioning system has traditionally been difficult to study, but new genetic models allow us to control the dopamine system using optogenetic tools, and thus understand the role of dopamine in brain synchronization in ways previously not possible. In particular, we will use Th:Cre rats that can be used in combination with a cre-dependent channelrhodopsin vector to control the dopamine system using light.

Serotonin is also an important neurochemical for executive functioning, in particular with regards to impulsivity and anxiety disorders. It has been demonstrated that a serotonin gene knock-out rat model (5HTT KO) shows altered stimulus-reward association learning and increased impulsive behavior (Nonkes and Homberg, 2013). This gene line has been proposed to be a useful model for studying impulsive characteristics, for example, in ADHD. There is evidence that this model shows impaired medial prefrontal theta oscillations and prefrontal-amygdala synchronization (Narayanan et al., 2011); we intend to replicate and expand this line of work and establish that this KO line is a useful model for studying the executive functioning network, and in particular, its interactions with sensory-processing brain regions.

WHAT WE DON'T KNOW

The non-invasive measurements in humans reflect aggregated activity of millions of neurons; many important hypotheses regarding the roles of theta oscillations in executive functioning simply cannot be tested in humans. Instead, we need direct access to the neural microcircuitry to understand how the integration and transfer of information in the brain supports executive functioning. This research in turn is important to understand how executive functioning is impaired. This is why research on rat models is necessary. More specifically, our research is organized around the following questions:

(1) *Are rats a good model for studying the role of medial prefrontal theta oscillations in the executive functioning network?* The answer is unknown, but it is important because it will help bridge the gap between research on humans and research on rodents. Nonetheless, we are optimistic that rats are indeed a useful model: several executive functioning tasks that are used in humans have been successfully adapted to rats (Courtière et al., 2007; Narayanan et al., 2013; Walton et al., 2002; Friedman et al., 2015) (many of our behavioral tasks are modeled after these published designs), and rats have robust theta oscillations in the medial prefrontal cortex, similar to humans. In other words, rats are an established *behavioral* model

for executive functioning, and oscillations in the rat brain share many characteristics with oscillations in the human brain. The critical link of theta during executive functioning tasks has not been made, and we intend to demonstrate this.

(2) *What is the function of medial prefrontal theta oscillations during executive functioning?* Based on non-invasive research in humans, it has been speculated that theta oscillations are involved in coordinating the activity of individual cells inside the medial prefrontal cortex, in subcortical structures like the striatum and thalamus, and also in sensory-processing regions. These hypotheses cannot be tested in humans, but are readily accessible in rats.

(3) *Is the executive functioning network sensory-modality-specific or modality independent?* Executive functioning has been assumed to be a unitary process in humans (Botvinick et al., 2001), but this assumption has not been directly tested, in part due to difficulties in isolating different sensory processes using EEG, and the inaccessibility of individual neurons, in humans. In humans, functional connectivity between the prefrontal cortex and the visual cortex has been demonstrated (Cohen, 2014), but whether similar patterns exist for other modalities is unknown. Furthermore, the roles of the thalamus and striatum are difficult to study in humans, because EEG cannot measure deep-brain activity with high precision, and fMRI cannot measure electrophysiological activity.

(4) *What is the role of dopamine in synchronization within the executive functioning network, and between this network and sensory processing regions?* The dopamine system is difficult to manipulate in humans, but thanks to new optogenetic tools in rats, we can control this neurochemical system very rapidly and very specifically.

(5) *Do 5HTT KO rats -- which behave impulsively and have altered stimulus-reward associations -- have altered patterns of theta oscillations and associated synchronization in the medial prefrontal cortex?* Establishing this link, in particular with regards to the interactions between the medial prefrontal cortex and sensory-processing regions, will be important for understanding the importance of serotonin transmission in executive functioning.

WHY WE ARE DOING THIS RESEARCH

The result of this research will be a better understanding of how the executive functioning network is able to modulate neural activity in brain regions responsible for sensory processing and cognition. This will be applicable to basic research in interpreting patterns of results seen in human EEG studies. By incorporating stimulation and pharmacology, this research also has important translational and application value. In particular, brain stimulation techniques (transcranial magnetic and electrical stimulation) are increasingly being applied as a treatment option in humans for Parkinson's disease and major depression, among other disorders, and dopamine medications (e.g., LDopa) have long been used to treat psychiatric conditions and movement disorders. Our research will help understand how these manipulations affect neural activity in the brain systems most important for executive functioning.

Therefore, an important component of this research is the application and development of cutting-edge data analysis techniques for characterizing neural activity. We will also make data available to other scientists for further development and analysis. In this way, the data will be used beyond our research, which facilitates the Replacement and Reduction principles of animal ethics. That is, other researchers will be able to use our data rather than acquiring new data in new animals.

References

- Botvinick MM, Braver TS, Barch DM, Carter CS & Cohen JD. (2001) Conflict monitoring and cognitive control. *Psychol. Rev.* 108, 624–52.
- Courtière A, Hardouin J, Burle B, Vidal F, Hasbroucq T. (2007). Simon effect in the rat: a new model for studying the neural bases of the dual-route architecture. *Behav Brain Res.* 179(1):69-75.
- Cohen MX (2014) A neural circuit for conflict detection and resolution. *Trends in Neurosciences* 37(9):480-90. Sept 25.
- Cohen MX, Donner TH (2013). Midfrontal conflict-related theta-band power reflects neural oscillations that predict behavior. *J Neurophysiology.* 110(12):2752-63.
- Cohen MX, Krohn-Grimberghe A, Elger CE, Weber B. (2007). Dopamine gene predicts the brain's response to dopaminergic drug. *Eur J Neurosci.* 26(12):3652-60.
- Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori K, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM. (2015). A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell.* 2015 Jun 4;161(6):1320-33.
- Narayanan NS, Cavanagh JF, Frank MJ, Laubach M. (2013) Common medial frontal mechanisms of adaptive control in humans and rodents. *Nat Neuroscience.*
- Narayanan V, et al., (2011). Social Defeat: Impact on Fear Extinction and Amygdala-Prefrontal Cortical Theta Synchrony in 5-HTT Deficient Mice. *PloS One.* e22600
- Pignatelli, M., Beyeler, A. & Leinekugel, X. (2012) Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J. Physiol. Paris* 106, 81–92
- Nonkes LJ, Homberg JR. (2013). Perseverative instrumental and Pavlovian responding to conditioned stimuli in serotonin transporter knockout rats. *Neurobiol Learn Mem.* 100:48-55.
- Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A. & Nieuwenhuis, S. (2004) The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* 306, 443–7.
- Walton ME, Bannerman DM, Rushworth MF. (2002) The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci.*;22(24):10996-1003.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The primary purposes of this research are:

(1) *Demonstrate that rats are a feasible model for studying the basic brain mechanisms of human executive functioning.* Rats behave comparably to

humans in executive functioning tasks (at least, simplified ones), and the rat medial prefrontal cortex exhibits strong theta oscillations, similar to the human medial prefrontal cortex. We intend to establish the missing link of theta during executive functioning tasks in rodents.

(2) *Determine how neural oscillations are used to coordinate information processing within the prefrontal cortex and with sensory processing regions.* The role of oscillations has mostly been studied in sensory cortex. We aim to establish that similar principles hold in the executive functioning circuit and its interactions with sensory-processing regions. These mechanisms will be tested via spike-field coherence (e.g., do theta oscillations in the prefrontal cortex control the timing of neurons in sensory cortices?) and spectral coherence (e.g., is population activity in the prefrontal cortex synchronized with population activity in sensory cortices?). Furthermore, we believe that oscillations play a role in allowing the thalamus and striatum to act as "middlemen" to regulate the flow of information between the prefrontal cortex and sensory regions.

(3) *Determine whether the executive functioning circuit has sensory-modality-specific functions or is generic for different sensory modalities.* This is crucial to understanding how "high-level" the executive functioning circuit is.

(4) Determine the role of dopamine in modulating synchronization in the executive functioning network. Dopamine is crucially involved in healthy cognition and impairments in several brain disorders, and understanding its role in synchronization of the executive functioning network is necessary to understand how dopamine medications affect brain function.

(5) Determine whether 5HTT KO rats exhibit impairments in the executive functioning network activity, relative to control animals. This is important for understanding the role of serotonin transmission in executive functioning and learning.

Feasibility of the research

This research is highly feasible. We will use behavioral tasks that have previously been shown to work in rodents (although they have not been combined with stimulation/electrophysiology). Furthermore, the research is developed with the 3 R's in mind; sophisticated experimental techniques will reduce discomfort of the animals while simultaneously increasing the amount of data obtained from each animal.

The research proposed here will be completed by a team of scientists who have previous experience using electrophysiology and optogenetics. Over the next 5 years, there will be several experienced scientists involved in the research, including 3-4 postdocs, 1-2 PhD students, and an animal technician. The proposed research will also benefit from close collaborations within the [REDACTED]. The PI has also written an authoritative textbook on neuroscience data analyses and statistics [REDACTED].

A large portion of this research is funded by an ERC Starting grant entitled [REDACTED]. The purpose of the grant is to make new discoveries regarding the neurobiological origin and functional significance of theta oscillations in the medial prefrontal cortex during executive functioning. This research is also supported by internal funds from the [REDACTED] and by NWO grants (e.g., Veni).

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Scientific relevance:

There is overwhelming evidence that the executive functioning network is critically important for healthy brain function and for learning associations between sensory information and rewards. But there is too little understanding of the microcircuit dynamics that support these aspects of cognition. The findings obtained in this research will be significant for researchers of human EEG and cognition, and for researchers of animals and computational models. A second scientific impact is that >10 TB of rich, high-quality neurophysiology data will be available to the scientific community, maximizing the knowledge gained from our data, and thus also reducing the number of animals that need to be used to obtain such data in the future.

Clinical relevance:

Dysfunction of executive control is implicated in many clinical disorders, ranging from mood disorders (obsessive compulsive disorder, major depression) to motor diseases (Parkinson's disease) to schizophrenia and addiction. It is known that these conditions are associated with aberrant patterns of neural activity and synchronization, but it is less clear what those patterns mean at the neural and circuit level, due to limitations of non-invasive neuroimaging in humans.

On the other hand, medications that are associated with improved executive functioning also alter patterns of neural synchronization. At present, there are no good rodent models for understanding why this is the case. Establishing a rodent model of oscillations and synchronization in executive functioning will provide a foundation for understanding how these networks are affected by disease models, and how efficacious medication improves functioning in these neural circuits.

Societal relevance:

Executive functioning is broadly relevant for many aspects of success in our world, ranging from social situations to work promotions to driving a car. The research described here will help understand how these functions are implemented in the brain, which is a necessary step towards understanding how these dysregulation in executive functioning contributes to neural disorders.

In summary, that the scientific, clinical, and societal significance of our research outweighs the potential discomfort the animals may experience.

3.4 Research Strategy**3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).**

The research contains three parts that are performed sequentially in each animal, according to the following numbered list, in order.

1. Surgery to implant electrodes and inject viruses. This first part lasts 5-9 hours, depending on the complexity of the surgery.
2. Behavioral tasks focused on key elements of executive functioning, under continuous monitoring of brain electrical activity, and causal interference via optogenetics and electrical microstimulation. This second part lasts up to 18 months or shorter if humane endpoints are reached. This part of the research will provide the data that will be analyzed off-line. The analyses are described in more detail in the Animal Procedures section. Briefly, we will focus on identifying theta oscillations in the medial prefrontal cortex during the behavioral tasks, and how those oscillations are related to neural activity in the prefrontal cortex and sensory areas.
3. Euthanasia and ex-vivo anatomical confirmation of electrode implantation. This third part ends the research for the animal.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Each animal will undergo the same three procedures in the same order (1-surgery, 2-tasks and recordings, 3-euthanasia). Differences arise in the specific tasks that will be used (in order to focus on different aspects of executive functioning) and specific animal models that will be used (wildtype, serotonin knock-out, dopamine cre). However, these specific aspects do not change the overall flow of the research, nor do they affect the amount of discomfort. Thus, from an ethics perspective and considering the animals' welfare, the entire research can be considered as one experiment protocol that comprises three phases.

Phase 1: Surgery

Surgery is performed to implant electrodes, cannulae, light fibers, and viruses to measure and modulate brain activity. Electrodes will be implanted to record neural activity from several distinct neural circuits simultaneously. Depending on the element of executive functioning investigated, 1-4 electrodes will be implanted into the brain.

In order to establish causal mechanisms, we will also provide brief stimulation using optical or electrical tools. For this purpose, a light fiber is implanted that will be connected to a light source during the experiment. For measuring extracellular dopamine and to deliver receptor agonists/antagonists, small cannulae will be implanted. After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows for chronic recordings for weeks to months, maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized.

Phase 2: Tasks and recordings

Adult rats will be tested in different behavior tasks during awake head-fixation (one of the tasks will involve freely moving animals). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for 60-90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, IR cameras and breathing monitors are used to allow behavior and physiology to be monitored for signs of distress.

All behavioral tasks are similar in that they involve learning stimulus-reward associations and behavioral responses from the rats to indicate their learning. Differences among tasks are designed to focus on different aspects of executive functioning, and are described in more detail in the Procedures section. Water and/or food restriction will be used to facilitate training and motivation during the behavioral tasks. Frequent liquid rewards are given during the tasks. We take special care regarding the amount of food/water restriction -- animals should be motivated to perform the tasks, but they should not be stressed or unhealthy. Healthy animals provide high-quality data, and this is obviously something we want to achieve.

Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation

This is necessary to check the anatomical location of the implantations and expression of the virus (for optogenetics).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The three phases of the research (surgery, tasks, euthanasia) are necessarily highly related. There is no point in doing surgery if there are no tasks to record data, and we cannot record neural activity during behavior without first performing surgery to implant the electrodes. The procedures we will use reflect the current state-of-the-art in neuroscience. We wish to understand the neural circuit mechanisms of executive functioning and control over sensory processing, and large-scale electrophysiology and interference with optogenetic/electrical microstimulation are currently the best tools for this.

This is fundamental research that is necessary in order for future research to use rats as models for studying diseases of human executive functioning.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Description of procedures for surgery and tasks.

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Description of procedures for surgery and tasks.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

PRIMARY OUTCOME MEASURES

The primary outcome measure is electrophysiological activity -- action potentials from individual neurons and local field potentials from electrodes placed in targeted cortical and subcortical regions. We focus on these features because (1) scientific thinking over the past century points to electrophysiological measurements (spikes and local field potentials) as being important markers of local and distributed brain function, and (2) this maximizes the use of the obtained data.

Behavioral performance on the tasks are a secondary outcome measure that will be used to ensure that the animals understand the task and to link to the neural data.

DIFFERENT TYPES OF NEURAL ACTIVITY WE WILL MEASURE

Neural oscillations: Oscillations reflect rhythmic fluctuations in population-level neural activity, and are our primary measure of mesoscopic-scale activity. Dynamics in different frequency bands can be decomposed and isolated using Fourier- and other related techniques. We have considerable expertise in these types of analyses [REDACTED]. Our analyses will focus on theta oscillations, because this will allow us to anchor our findings to the scientific literature on human executive functioning. However, all analyses are done off-line, meaning we can re-analyze the data for other characteristics (e.g., gamma oscillations).

Action potentials ("spiking"): Neurons emit brief action potentials that are widely believed to be the primary mode of signaling in the nervous system. Changes in spike rate and timing can be linked to learning and decision-making during the tasks.

Spectral coherence: Inter-regional communication in the brain is thought to be facilitated by synchronization, or correlated patterns of oscillatory activity. Obtaining evidence for synchronization requires multiple electrodes in the brain in the same animals. In order to determine whether there is functional connectivity and how it is modulated by the tasks, we will use spectral coherence, an established analysis technique for synchronization between electrophysiological activity in different brain regions.

Spike-field coherence: This involves testing whether the firing of single neurons is synchronized with the local field potential oscillations recorded in the same region or between distant regions. Spike-field coherence is one way to measure the extent to which one brain region exerts a bias over processing in another brain region.

ALTERNATIVE OUTCOMES

It is possible that we not find strong evidence for a role of theta oscillations in executive functioning in rats. Such a result would limit our ability to generalize the findings to humans, therefore suggesting that humans and rats have at least partly distinct neural mechanisms for executive

functioning. In this case, we would continue our research as planned but focus the analyses on the most robust aspects of the findings. In other words, because of the novelty of this research, our findings will provide important insights into neural computations underlying executive functioning regardless of whether our hypothesis regarding the role of theta oscillations is confirmed.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

All animals will undergo the same three phases of the experiment, in the same order (1-surgery, 2-tasks, 3-euthanasia). Different groups of animals will be used to investigate different aspects of executive functioning, but from an ethics/welfare perspective, these differences do not change the amount of discomfort that the animals will experience. Below we describe the details of the procedures that are relevant for animal welfare. In the Phase-2 section below we also list the number of animals per experiment/group.

Phase 1: Surgery

Surgery is performed to implant electrodes and inject viruses to measure and influence brain activity. We follow standard established protocols that increase scientific benefit and precision, while minimizing discomfort. Surgery is performed on healthy adult animals. Inhalant anesthesia is provided, and body temperature and respiration are continuously monitored during the surgery. Animals will receive both pre- and post-operative analgesia and prophylactic antibiotics to minimize pain and risk of infections. Animals are checked frequently after surgery for signs of distress or sickness (e.g., eating and grooming habits, fur quality, etc.).

Because of viral injections, surgeries take place in a class-II biosafety cabinet in a DM-II facility. Depending on the target, we will use either replication-defective Adeno Associated viruses (AAV)/CAV2/G-deleted, pseudotyped Rabies viruses or concentrated replication-incompetent, self-inactivating lentivirus. Different viruses are used to target different subclasses of cells, but none of the viruses are associated with any discomfort, brain damage, behavioral impairments, or bodily harm. Instead, the virus causes the production of opsins in neurons that allow us to provide microstimulation to briefly excite or inhibit those neurons.

State-of-the-art electrodes will be implanted to record the activities of several dozens of neurons and neural circuits simultaneously. Improved electrode technology allows for smaller and thinner probes (meaning less damage to the brain as the electrode is implanted). Depending on the experiment protocol, electrodes will be implanted into the cortex, thalamus, striatum, ventral tegmental area, or locus coeruleus. Surgical implantation is done via digitally controlled manipulator arms that provide very high targeting precision, based on standardized rat brain atlases. In most cases, the virus and electrodes are implanted in the same session, minimizing the time spent under anesthesia. For animals in the reward learning tasks, small cannulae will be implanted to deliver dopamine receptor antagonists or to measure extracellular dopamine concentration via fast-scan cyclic voltametry. This is part of the continuous monitoring, and does not cause any additional discomfort.

After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows chronic recordings for up to 18 months (or less if humane endpoints are reached), maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized. Electrodes and optical fiber are secured to a headpost, which is like a cap that is secured to the skull via screws and bone cement. The headpost is 3D-printed to be strong yet light. Animals quickly adjust to the presence of the headpost and are not impeded by it during daily activities. We have gained considerable expertise

at designing and implanting these devices, and are confident that it causes minimal discomfort while maximizing scientific benefit. We use special-designed cages that are taller to prevent the headpost from accidentally hitting the top part of the cage.

Recovery time from surgery is typically 3-5 days.

Phase 2: Tasks and recordings

Adult rats will be tested in awake head-fixation during behavior tasks (the effort-conflict experiment will involve freely moving animals). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for 60-90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, IR cameras and breathing monitors allow behavior and physiology to be monitored for signs of distress.

Below is a list of the tasks we will use. All tasks are similar in their duration and amount of discomfort; the different tasks are designed to test different aspects of executive functioning. Each experiment will include **12 animals per group**. A statistical justification for this number is provided in the next section. Some behavioral training will begin prior to surgery to familiarize the rat to the experimental setup and stimuli. Head fixation is gradually introduced through handling and rewards, following standard procedures used at the Radboud and many other universities.

Reward learning task (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in four groups: 5HTT knockout model, WT sham controls, Th:Cre optogenetics, sham optogenetics). The purpose of these tasks is to investigate the local and long-range neural circuitry underlying reward learning-related interactions between the executive functioning network and sensory processing regions. Rats will undergo operant reward conditioning. Stimuli of different modalities (visual, auditory, whisker) will be paired with liquid rewards, while other stimuli will not be paired with rewards (punishments and aversive stimuli will not be used). Licking spouts will be available to indicate behavioral responses. Dopamine interventions using optogenetics and receptor antagonists are applied to the Th:Cre and sham groups. Optogenetics will be used to modulate the dopamine system to determine its role in learning and inter-regional synchronization, and receptor antagonists are applied during learning to determine receptor specificity of the synchronization effects. Electrodes will be implanted in the cortex (prefrontal and relevant sensory area), striatum, VTA, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 144 (12 animals per group, 3x4 groups for sensory modalities and animal type)

Sensory detection/discrimination tasks (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in four groups: 5HTT knockout model, WT sham controls, Th:Cre optogenetics, sham optogenetics) The purpose of these tasks is to investigate how sensory processing is modulated by top-down control of the executive functioning network, how this top-down control is modulated by dopamine (assessed via optogenetics and receptor agonists), and how it might be compromised in hyper-vigilant models (the 5HTT animals). Rats will be trained to report the detection of a brief and weak sensory stimulus, or between two similar stimuli, i.e., low (~15 Hz) and high frequency (~90 Hz) whisker vibrations. Sensory stimulation may be visual, auditory, or pulsatile whisker vibration, following established protocols (e.g., Mayrhofer et al. 2013; Friedman et al., 2015) that we have determined to be successful in our previous studies. Behavioral responses are reported by tongue lick, and liquid rewards are given for performance. Electrodes will be implanted in the cortex (prefrontal, parietal and relevant sensory area), VTA, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 144 (12 animals per group, 3x4 groups for sensory modalities and animal type)

Response conflict task (one group for optogenetics and one for sham): The purpose of this task is to examine neural and systems-level activity in an executive functioning task that is established in humans (Cohen, 2014) and in rats (Courtière et al., 2007), although it has not been done using electrophysiology or optogenetics. Rats learn that licking a left-side post is rewarded for picture "A" on a computer screen, and that licking a right-side post is rewarded for picture "B". Pictures are displayed on the left or on the right side of the animal. Response conflict is induced when picture "A" appears on the left side of the animal but it must make a rightward movement (the conflict is between reward-associated approach behaviors and the goal-relevant behavior). Additional control conditions will include sensory stimuli not associated with any particular behavioral responses or rewards (to rule out potential explanations of task-irrelevant sensory processing). Electrodes will be implanted in the cortex (medial prefrontal and relevant sensory area), striatum, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 24 Th:Cre

Effort-conflict task (one group for optogenetics and one group for sham): The purpose of this freely-moving experiment is to determine the contribution of the medial prefrontal cortex and striatum to effort-based decision-making. The task is modeled after published designs shown to be successful in rats (Friedman et al., 2015; Walton et al., 2002). Our novel and important contribution will be the large-scale electrophysiology and optogenetics to determine how synchronization in the executive functioning network contributes to the decision of whether to exert additional effort for a larger reward. Rats will run down a T-maze and will be able to choose whether to climb a small barrier for a small reward, or a larger barrier for a larger reward. This is an established experiment and requires an intact medial prefrontal cortex (Walton et al., 2002). Electrodes will be implanted in the cortex (medial prefrontal and relevant sensory area), striatum, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 24

Resting "task" (all animals): Rats will not be required to perform any specific behaviors, but instead will simply remain calm. We will use similar stimulation protocols as described above. These recordings provide an important comparison condition for the task-related dynamics.

Electrical and optogenetic stimulation

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the medial prefrontal cortex. We therefore expect that silencing the thalamus during executive functioning tasks will cause a reduction or elimination of medial prefrontal theta. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to test these hypotheses using alternative methods.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic. Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity and is therefore more physiologically realistic. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature.

Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation

To achieve interpretable results, it is important that all animals remain healthy and do not show signs of stress or reduced well being during all experimental procedures. Indeed, only healthy animals can provide the best quality data. Animals will be checked daily for any signs of sickness. Humane endpoints of the research are reached by overt signs of sickness, loss of body weight (more than 15%) or other indications of reduced well being.

If discomfort levels appear to be unusually high (immobility, refraining from drinking or eating, pale color of eyes and skin), the animal will be euthanized and a post-mortem examination will be performed with the aim of understanding possible causes and potentially further refining our procedures.

Euthanasia will be performed with an injection of pentobarbital. After carefully checking the level of anesthesia (absence of tail-pinch reflex), perfusion with paraformaldehyde will be completed in order to remove and section the brain for histological verification of electrodes and fiber placements, and viral expression.

Pilots

It is important to optimize our surgical and experimental techniques. This will improve the scientific quality of the data as well as minimizing discomfort for the animals. We therefore request an additional 30 (WT) rats for piloting (10-15 for behavioral task piloting, and 15-20 for surgery piloting). These will be used to test surgical procedures and ensure that the tasks are sufficiently well-designed.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

STATISTICS FOR NEURAL DATA

For the neural data, we focus on time-frequency-based analyses of oscillations, synchronization, and spike-field coherence. The primary PI involved in this research is an expert in these kinds of data analyses, as exemplified by his 600-page textbook on neuroscience data analyses and statistics [REDACTED]. Each animal will provide many hundreds of trials of data, ensuring a large probability of high-statistical-power results.

Statistical analyses vary depending on the specific analysis, but mostly involve either (1) non-parametric permutation-based testing or (2) parametric test such as ANOVAs or multiple regressions. Multiple comparisons issues are addressed using: (1) cluster- or maximum-pixel correction for time-frequency-space analyses; (2) Bonferroni correction across groups; (3) split-half replication, in which all analyses are performed on 50% of the data, and the findings are confirmed in the other 50% of the data.

STATISTICS FOR BEHAVIORAL DATA

Behavioral data analyses will generally utilize t-tests or ANOVAs, as appropriate per experiment. In some cases we will also perform cross-trial correlations between brain and behavior within-animal, using either Spearman correlations or general linear models. Corrections for multiple comparisons are applied as appropriate, as are corrections for sphericity violations in the case of unbalanced multifactor ANOVAs.

CALCULATION OF THE NUMBER OF ANIMALS PER GROUP

Having a sufficient sample size is crucial in neuroscience experiments (Button et al., 2013; Nieuwenhuis et al., 2011). In total, we will utilize 12 animals per group. This number is derived from power analyses of previous literature. For example, the effect sizes from one study using similar analyses (van Wingerden et al., 2014) suggests that 11 animals is sufficient for a power of $\beta=.8$ and $\alpha=.05$. Having 12 animals also provides some buffer in case we need to exclude data if a few animals are not able to complete the tasks, if there are technical problems, or if humane endpoints are reached. Post-hoc power analyses will be conducted on our findings and reported in our publications.

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, Munafò MR. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14(5):365-76.

Nieuwenhuis S, Forstmann BU, Wagenmakers EJ. (2011). Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nat Neurosci.* 2011 Aug 26;14(9):1105-7.

van Wingerden M, van der Meij R, Kalenscher T, Maris E, Pennartz CM. (2014). Phase-amplitude coupling in rat orbitofrontal cortex discriminates between correct and incorrect decisions during associative learning. *J Neurosci.* 2014 Jan 8;34(2):493-505.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

We will use three types of animals. In the previous sections we outlined the justification of animal numbers for each experiment. We will use males for the dopamine studies, because estrus-cycle effects on the dopamine system may affect our results. For other studies we will use males and/or females.

Sprague Dawley. These animals are known for being calm and easy to handle. They are also one of the most commonly used breed in neuroscience, which facilitates comparisons across experiments.

Th:Cre. These animals express cre-recombinase in cells that contain tyrosine hydroxylase, which is an enzyme involved in the production of dopamine. It is therefore a marker of dopamine cells and allows us to target dopamine cells in optogenetic studies (Witten et al., 2011). Their background is Sprague-Dawley, which makes them comparable to the non-Th:Cre rats. This strain is not associated with any behavioral, cognitive, or physical impairments, or any other genetic disorders.

5-HTT Knockout. These animals show an increased sensitivity to environmental stimuli for behavioral guidance. This is expressed as an increased cognitive performance in tasks assessing the ability to change behavior in response to changes in the predictive values of (conditional) environmental stimuli, and changes in response rule (Nonkes et al. 2012, 2013, 2014). They are an important model for executive functioning.

Wistar wild-type (WT). These are the same background as the 5-HTT knockouts and serve as WT controls.

The table below illustrates the number and types of animals for each experiment.

Strain	Task					Grand total
	<u>Rew. Learn</u>	Sensory	Conflict	Effort	Pilot	
<u>5HTT KO (Wistar)</u>	36	36	0	0		
<u>Wistar WT</u>	36	36	0	0		
<u>ThCre (Sprague Dawley)</u>	36	36	12	12		
<u>Sprague Dawley WT</u>	36	36	12	12	30	
Totals	144	144	24	24	30	366

Nonkes LJ, van de Vondervoort II, Homberg JR. (2014). The attribution of incentive salience to an appetitive conditioned cue is not affected by knockout of the serotonin transporter in rats. *259:268-73*.

Nonkes LJ, Homberg JR. (2013). Perseverative instrumental and Pavlovian responding to conditioned stimuli in serotonin transporter knockout rats. *Neurobiol Learn Mem. 100:48-55*.

Nonkes LJ, ... Homberg JR. (2012). Serotonin transporter knockout rats show improved strategy set-shifting and reduced latent inhibition. *Learn Mem. 19(5):190-3*.

Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev. 2014 Mar;40:1-5*.

Witten IB, ... Deisseroth K (2011). Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron, 72(5):721-33*.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Own breeding colony: Sprague Dawley WT	126	Adult
Rat	Own breeding colony: Sprague Dawley Th:Cre	96	Adult
Rat	Own breeding colony: Wistar WT	72	Adult

Rat	Own breeding colony: Wistar 5HTT KO	72	Adult
-----	--	----	-------

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement.

There are several large-scale efforts to develop accurate computational models of the brain or brain subsystems. Though promising, these models still require confirmation from empirical studies. In our own research, we are working on a computational model of medial frontal cortex functioning that will be informed by this research. However, at present, the kinds of experiments discussed in this proposal are necessary to develop a better understanding of brain function. Thus, it is currently not possible to replace animal models with computer simulations. Furthermore, lower animal species such as insects do have sufficient cognitive capabilities to make them valid models for understanding cognitive function in humans.

The primary measurement technique used here -- invasive electrophysiology -- is generally not available in humans. There are some clinical situations in which subdural electrodes are placed (e.g., epilepsy or deep-brain-stimulation), but these recordings are generally made from unhealthy tissue, these patients are infrequent and difficult to access, and the recordings often do not include spikes. Thus, rodents are necessary and at present cannot be replaced by another species.

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of rats needed to answer the research questions, while having a sufficient number of animals for high statistical power. As mentioned earlier, there are two important components of our research that work towards reduction of the number of animals that will be tested. First, we obtain high-density multisite chronic recordings from each animal. This sharply reduces the number of animals we need to test to obtain sufficient data. Second, we will make all of our collected data publicly available for other scientists to download and use. This reduces the number of animals tested by other research groups around the world, because several hypotheses can be tested in our data, rather than having to collect new data.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. We believe that only healthy animals with minimal stress can provide the high-quality scientific data that we seek. Therefore, we are highly motivated to refine our procedures as best as possible.

The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. Furthermore, we are continuously monitoring and discussing our procedures to minimize discomfort and improve the health and well-being of the animals. For example, stringent aseptics will be used during surgery to minimize discomfort and facilitate recovery. There are several groups at our institute who use similar surgical and experimental procedures, and we discuss in group meetings issues related to improvement of animal welfare.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Our procedures are guided by strong considerations for the welfare of the rats. Unhealthy or stressed animals provide bad data, and it is thus obvious from both scientific and welfare perspectives that the animals must be kept as healthy and comfortable as possible. Furthermore, we continuously seek to improve our procedures, and this topic is often discussed in group meetings. Section H3 details sources of discomfort and how we will seek to minimize or mitigate them.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Non applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

[X] Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Following is a list of components of the research that may cause discomfort, and how we will minimize discomfort.

Initial arrival. After arrival or transfer from the breeding facility, animals will be allowed to adapt to the animal facility for at least 7 days. They will be singly housed, and will be in sight and sound contact with other rats. They will be regularly weighed and checked for general health. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures. Cage enrichment is available.

Surgical implantation of electrodes and viruses. Animals will be weighed and anesthetized with 2-4% isoflurane (4-5% for induction) according to standard protocol. During surgery, animals will be placed on a heating pad and their heart rate and blood oxygenation levels will be monitored continuously. After thorough cleaning of the skin surface, lidocaine (2-4%) will be injected locally around the incision site. Surgery is performed while the animal is under isoflurane-maintained anesthesia. Analgesic treatment with buprenorphine during surgery is provided, because although animals are not conscious of the pain during surgery, it can still sensitize the central nervous system causing more pain post-operatively (analgesics will minimize post-op pain).

NaCl will be given subcutaneously to keep the rats hydrated. Rats receive sterile 0.9% NaCl injections subcutaneously: 5 ml per 100 g of body weight, distributed in several injection sites, max 5 ml per site. The total amount of fluid should not be more than 25 ml, even if the animal weighs more than 500 grams. Carprofen is administered before they wake up at 5 mg/kg bodyweight. Animals will be kept under observation at 30C, and moved to its cage after approximately after 1 hour where they will have free access to food and water post-surgery. 24 hours after surgery animals are injected with analgesic carprofen. During one week after surgery their behavior, appearance and weight are monitored closely.

Post-surgical procedures. Animals will receive carprofen (4-5 mg/kg, s.c.) and buprenorphine (0.05-0.1 mg/kg in saline s.c.) after surgery as an analgesic. This will be repeated 24 hours later with both carprofen and buprenorphine and carprofen again 48 hours later. Three milliliters of saline (at body temperature) will be administered s.c. to prevent dehydration. A heating pad will be placed under the recovery cage to further facilitate post-anesthesia recovery, and will be closely monitored until fully recovered from anesthesia. Once awake, rodents will be placed in their home cage in an independently ventilated cage (IVC) located in a DM-II room for a 2-week quarantine period. After said period, animals may be considered virus free and returned to our conventional lab space. Animals will be weighed and checked for general health and recovery from surgery (wound recovery, mobility, etc.) daily for minimum of 3 consecutive days, but typically 5 days, until they regain their pre-operative weight. Animals that do not adequately recover from surgery and show reduced signs of well-being (loss of more than 15% of pre-operative body weight) will be euthanized in accordance with "humane end points." Several research groups at the institute have extensive experience with these general stereotaxic techniques and have developed a highly standardized protocol for both the surgical procedures as well as pre-, peri- and post-operative care. Animal welfare logbooks will be kept. Rodents will be allowed to fully recover before commencement of the experiment procedures.

Housing. Single housing is necessary for this research because of the headpost that is attached to the head. Other rats may bite or scratch at this construction, which would cause damage and could lead to infection or death. However, single housing can cause moderate discomfort for rats,

because they are social animals. All cages are kept in close proximity, meaning rats can see, hear, and smell each other. Animals are checked daily for signs of sickness or stress, and are frequently weighed (typically, daily).

Food and water restriction. Water or food restriction is necessary to keep animals motivated to learn and perform the tasks. In general, we prefer water restriction over food restriction for three reasons: It causes less discomfort, it is easier to regulate, and it has a faster time-course (animals get thirstier faster than they get hungry). In our experience, water (particularly with some added sucrose) is an excellent reward for training. Food restriction is used when water restriction is insufficient. However, excessive restriction is neither necessary nor desirable. Animals will be kept at approximately 90% body weight during training and during early phases of the recordings. If weight drops below 85%, ad libitum food and water are provided until they return to normal weight. Restriction becomes less necessary as the animals are familiarized and trained on the task.

Behavioral tasks. The tasks are not associated with any direct discomfort (no punishments, shocks, or other aversive stimuli are used). All tasks involve some reward component (typically, liquid reward delivered through spouts). Breaks are provided every 10-20 minutes to allow the rat to relax or run on a treadmill or disk. Recording sessions will last no longer than 90 minutes per day, or shorter if there are signs of stress or discomfort, for up to five days per week. Head-fixation causes discomfort, particularly in the beginning. Animals are introduced to head-fixation slowly and are given rewards like sucrose water, soy milk, and sweet yogurt. Within days to a few weeks, animals learn that the head-fixation is safe, is associated with rewards, and does not last very long.

Stimulation. Based on literature and our previous experience, focused brain stimulation techniques do not cause any noxious effects. The stimulation is titrated per animal to be as minimal as possible while producing a measurable effect.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

See H3

Explain why these effects may emerge.

See H3

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

See H3

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Humane endpoints include overt signs of sickness or clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment). Other risks arise from errors or infections during surgery and implantations. Needless to say, each animal is important and we do our best to avoid unnecessary risks or infections. In our experience, humane endpoints resulting from experimenter or surgical errors in <5% of cases. In such events, discussions are held to determine the source of the mistake and strategies to improve our techniques.

Indicate the likely incidence.

Based on previous research and our experience, we anticipate <5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort resulting from the surgery and recover from anesthesia, as well as moderate discomfort from single-housing (animals are in continuous smell/sound range of each other, which mitigates this source of discomfort to some extent). Even in the exceptional situation of an infection (<5%), pain management drugs and timely application of the humane endpoints will prevent extreme discomfort. From the group of 30 pilot animals, 10-15 animals will be used for task piloting and optimization. These animals will not undergo surgery or anesthesia, and may experience mild discomfort from food or water restriction.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

It is necessary to confirm the expression of the virus and placement of the electrodes in post-mortem imaging of the brain.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Format**Niet-technische samenvatting**

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven.
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
1.2	Looptijd van het project	18-4-2016 - 18-4-2021
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	executieve functies, cognitie, hersenactiviteit, fundamentele onderzoek

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>De executieve functies (EF), zoals werkgeheugen, gedrag aanpassingen, en besluitvormingsproces, zijn belangrijk voor het leven in de samenleving. Verstoringen van de EF zijn een belangrijk onderdeel van hersenziekten zoals Parkinson's en schizofrenie.</p> <p>Het meeste onderzoek naar de EF is in mensen gedaan. In mensen kan de gemiddelde activiteit van miljoenen hersencellen tegelijk gemeten worden. Uit onderzoek bleek dat zogenoemde "elektrische hersengolven" een teken zijn van EF. Maar wat precies zijn die hersengolven en wat doen ze voor de communicatie tussen hersengebieden die belangrijk voor EF zijn?</p> <p>De bedoeling van ons onderzoek is meer inzicht vergaren in de neurale mechanismen van de EF. Wij gebruiken daarvoor rat-modellen. Hierdoor kunnen wij elektroden in de hersenen plaatsen en de activiteit van individuele hersencellen, groepen van hersencellen, en populatie activiteit tegelijkertijd meten. Daardoor kunnen wij de processen van de EF nauwkeuriger in kaart brengen en begrijpen.</p>
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Er zijn vele fundamentele vragen over hoe informatie wordt verwerkt binnen het "EF netwerk" zoals: hoe wordt informatie gedeeld binnen deze regionen, hoe beïnvloedt het EF netwerk processen in sensorische gebieden, en wat is de rol van neurochemicaliën zoals dopamine hierin?</p> <p>Dit fundamentele onderzoek is van belang om in de toekomst beter te begrepen wat er in de hersenen mis kan gaan, zoals bijvoorbeeld bij Parkinson's ziekte. Wij zullen ook alle onze data beschikbaar maken aan de wetenschappelijke gemeenschap.</p>
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Maximal 366 ratten over 5 jaar.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<p>Om goede metingen te kunnen verrichten worden er speciale elektroden in het brein geplaatst middels een operatie. Deze operaties en het bijkomen uit narcose zullen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en antibiotica worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken.</p> <p>Wij gebruiken lichte water- en voedselbeperkingen om de gedragsmotivatie van de ratten te verhogen. Zij krijgen sap en andere beloningen tijdens de experimenten.</p>
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Alle dieren ondergaan vergelijkbare handelingen die een matig ongerief als gevolg hebben.

3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Alle dieren worden na afloop van de proef gedood (door middel van anesthesie pijnloos) om hersenweefsel te onderzoeken.
-----	---	---

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Metingen in mensen zijn niet precies genoeg om zenuwcellen te meten. Daarom zijn dierproeven die hier beschreven worden nog noodzakelijk.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Wij gebruiken speciale elektroden die heel veel gegevens kunnen verzamelen per dier. Wij maken onze meetgegevens openbaar beschikbaar aan de wetenschappelijke gemeenschap. Andere wetenschappers zullen daardoor minder zelf dierproeven hoeven te doen.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	Alle handelingen zullen worden verricht door ervaren personeel. De experimenten en diermodellen die we gebruiken staan bekend om de betrouwbare resultaten. Wanneer mogelijk werken wij aan het verbeteren van onze experimenten en procedures. Het is onze overtuiging dat de beste resultaten behaald worden met gezonde dieren met een zo laag mogelijk stressniveau.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Alle handelingen zullen worden verricht door ervaren personeel. Alle dieren krijgen de tijd om te wennen aan de nieuwe leefomgeving en de onderzoeker. Ratten moeten alleen gehuisvest worden. Desondanks kunnen ze contact hebben met andere ratten. Rondom operaties zal adequate pijnstilling worden gegeven. Rondom operaties wordt nutriëntenrijk voedsel aangeboden om het herstel te bevorderen. In alle gedragsproeven worden ratten beloond (sap, yoghurt, enz.). De dieren krijgen nooit vervelende of pijn stimuli.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0129
2. Titel van het project: Neural synchronization and executive functions
3. Titel van de NTS: Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-12-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 11-01-2016 en 02-02-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-01-2016 tot 25-01-2016 en van 08-02-2016 tot 12-02-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 12-02-2016
 - advies aan CCD: 17-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-01-2016
 - Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.1 Uit de bijlage blijkt dat de onderzoekers drie verschillende sensorische modaliteiten willen onderzoeken. De rationale hiervoor ontbreekt in de beschreven achtergrond.

-3.2 De onderzoekers willen hypothesen testen over hoe neurale oscillaties een rol spelen bij de verwerking van sensorische informatie door de prefrontale cortex in relatie met gebieden in thalamus en basale ganglia die samen het executieve netwerk vormen. De connectiviteit tussen de diverse delen van het netwerk lijkt daarbij van belang. Deze hypothesen zijn verder

niet uitgewerkt. Welke hypothesen bedoelen de onderzoekers precies, en kunnen zij in de beschrijving van de strategie aangeven hoe zij deze hypothesen zullen testen?

-3.4 Het hoofddoel van dit onderzoek is te evalueren of (en hopelijk aan te tonen dat) ratten een goed model zijn om de specifieke neurale mechanismen te bestuderen die ten grondslag liggen aan executief functioneren. Bij welke uitkomsten zijn ratten een goed model om het menselijke executieve functioneren te bestuderen? Verder zijn de onderzoekers op zoek naar een beter begrip hoe de neurale activiteit in hersengebieden voor cognitie en sensorische prikkelverwerking het executief netwerk bestuurt. Ook deze vraagstelling is niet nader uitgewerkt.

De commissie vraagt zich af of er een fasering mogelijk is. Kunnen de onderzoekers eerst aantonen dat de rat een goed model is om executief functioneren in te onderzoeken (bijvoorbeeld doordat er (een equivalent van) theta-golven bij ratten ontstaan door executief functioneren), alvorens zij de invloed van het executief netwerk op andere hersengebieden gaan onderzoeken? Overigens wil de commissie opmerken dat de theta-golven bij de rat een andere relatie tot gedrag hebben dan bij de mens.

-3.4.1 De strategie voor het behalen van de doelstelling ontbreekt ten enenmale. De onderzoekers geven alleen een beschrijving van de dierproeven die uitgevoerd zullen worden, zonder toe te lichten welke onderzoeksvragen zij met deze dierproeven denken te beantwoorden. Zo blijft het in de huidige aanvraag volstrekt onduidelijk hoe de dierproef zal leiden tot de onder 3.2 geformuleerde eerste doelstelling. Ook wordt niet ingegaan op de onderzoeksvraag waarvoor het nodig is om een specifiek hersengebied elektrofyysiologisch of optisch te stimuleren.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.1 The following text was added to section 3.1:

Does the executive functioning circuit work the same way for different sensory modalities (e.g., vision, audition, whisker stimulation)? It has been assumed to be the same generic process in humans (Botvinick et al., 2001), but this assumption has not been directly tested, in part due to difficulties in isolating different sensory processes using non-invasive measurements in humans. In humans, functional connectivity between the prefrontal cortex and the visual cortex has been demonstrated (Cohen, 2014), but whether similar patterns exist for other modalities is unknown. It is important to determine whether the mechanism by which the executive functioning circuit biases processing in sensory areas is the same for different sensory modalities.

And the following text was added to section 3.2:

The primary purposes of this research are ... determine whether the executive functioning circuit has sensory-modality-specific functions or is generic for different sensory modalities.

-3.2 The following text was added to section 3.1:

Furthermore, the roles of the thalamus and striatum are difficult to study in humans, because EEG cannot measure deep-brain activity with high precision, and fMRI cannot measure electrophysiological activity. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus gates sensory information into the medial prefrontal cortex in order for the prefrontal cortex

to detect competing sensory inputs. Only research in rats can provide evidence for these kinds of hypotheses.

And the following text was added to section 3.2:

The role of oscillations in information-transfer has been demonstrated, for example in primary visual cortex and in computational simulations of neural networks. We aim to establish that similar mechanisms hold between the executive functioning circuit and sensory regions. These mechanisms will be tested via spike-field coherence (do theta oscillations in the prefrontal cortex control the timing of neurons in sensory cortices?) and spectral coherence (is population activity in the prefrontal cortex synchronized with population activity in sensory cortex?). Furthermore, we believe that the thalamus and striatum act as "middlemen" to regulate the flow of information between the prefrontal cortex and sensory regions.

Finally, we clarified the outcome measures in the section Experiment approach and primary outcomes parameters in the description of animal procedures.

-3.4 It is known that rats can perform executive functioning tasks (at least fairly simple tasks) in a comparable way as humans (in terms of behavioral performances). Furthermore, theta oscillations have been reported in the rat prefrontal cortex during rest and tasks that do not involve executive functioning. But the critical link between theta and executive functioning is missing in the literature. We will use tasks that have been used in humans or that can easily be adapted for use in humans. Our analyses will focus on characteristics of the data that are similar between rats and in humans. That is the anchor point to investigate patterns of spiking and other factors that are not possible in humans.

Several additional statements have been added along these lines, in the background and in the primary outcome measures.

Thank you for the interesting suggestion about staging of the research. However, we feel this is not the best use of the animals, for ethical and for scientific reasons. Scientifically, if we don't find strong executive-functioning-related theta oscillations, the studies are still worth continuing; we would then shift the focus of the analysis to whatever is the most robust finding. Mainly, this will limit the ability to generalize the findings to humans. Furthermore, having multiple electrodes provides an enormous scientific benefit beyond having a single electrode.

From an ethical perspective, the main discomfort of this research comes from surgery; implanting more than one electrode provides little additional discomfort (the weight of the electrodes is negligible), except that the surgery takes a bit longer. Given the major increase in scientific benefit with minimal increase in discomfort, there seems to be no advantage of using animals only for single-electrode implantations (except during piloting).

This is now clarified in a new subsection in Experiment approach and primary outcomes parameters in the description of animal procedures.

The following text was added to 3.1:

IS ALL "THETA" THE SAME?

There is no unitary "theta function." In humans it has been demonstrated that theta oscillations in occipital cortex are different from theta oscillations in the medial prefrontal cortex, which are different from theta oscillations in the hippocampus (Cohen, 2014). Although most people associate "theta" in the rat with hippocampus and memory, other findings have shown that theta in the prefrontal cortex is independent of hippocampal theta (different frequency, different statistical characteristics, and so on) (Pignatelli et al., 2012). This is why the multielectrode recordings are critical, and why our research will be important for understanding the role of neural oscillations in brain function.

-3.4.1 I apologize for the confusion. I am unsure what changes to make here, because more detailed descriptions are provided in the animal procedures section. I was specifically instructed to keep section 3.4.1 as brief as possible, and to provide only a simple overview of the main components of the research as they relate to animal welfare and experimental procedures, not how the hypotheses will be tested in off-line data analyses. The revised version contains additional material indicating that the behavioral tasks provide the electrophysiological data we will analyze, and that more details are provided in the animal procedures section.

The following text was added to Animal Procedures:

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the MFC. We therefore expect that silencing the thalamus during executive functioning tasks will cause a reduction or elimination of MF theta. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to do it any other way.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic. Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity and is therefore more physiologically realistic. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 08-02-2016

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

- 3.1 De werking van het brein is nog onvoldoende toegelicht in de achtergrondbeschrijving van de aanvraag om de onderzoeksstrategie te kunnen navolgen. De rol van neurochemicaliën zoals dopamine (waarnaar wordt verwezen in de niet-technische

samenvatting) is bijvoorbeeld nog onderbelicht (zie ook de vraag over onderdeel B van de DAP).

Description of Animal Procedures:

-B: De kolom Origin in de tabel is niet goed ingevuld: betreft het dieren uit eigen fok of worden zij van een bedrijf gekocht?

-B:De rationale voor het gebruik van de 5-HTT knockout en Th:Cre ratten is onvoldoende toegelicht. Hierover is niets vermeld in de achtergrondbeschrijving van het projectvoorstel.

-H3: De commissie is van mening dat het ongerief van solitaire huisvesting gedurende 18 maanden matig is in plaats van 'minor'. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

- Datum antwoord: 12-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.1 It is clear to me now that the previous version was too technical and lacking the "big picture" goals. I tried to streamline section 3.1, which resulted in adding new text, deleting redundant or confusing text, and moving other text around. Because of the myriad changes, I decided not to highlight this section in red font, because the entire section would be highlighted and this is annoying to read. I also changed some text in sections 3.2 (in red font). I hope this section is now more comprehensible and comprehensive.

Description of Animal Procedures:

-B: I apologize for the confusion, as I was previously given different advice. All animals are taken from local breeding facilities. This information is included in the "Origin" column of the animal table.

-B:Thank you for pointing out that this was not sufficiently clarified. I hope the revised section 3.1 now clearly describes our motivation for using these groups.

-H3: The level of discomfort was changed from minor to moderate in sections H3 and K1.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'a better understanding of how the executive functioning network is able to modulate neural activity in brain regions responsible for sensory processing and cognition'. De hoofddoelstelling is uitgewerkt in vijf subdoelen die met elkaar bijdragen aan meer inzicht in de werking van het executief netwerk'. De onderzoekers focussen daarbij op theta oscillaties omdat die optreden bij executief functioneren bij mensen, en hun relatie tot de actiepotentialen van individuele neuronen in de hersenen van ratten die gedragstesten voor executief functioneren uitvoeren. Ook zal worden gezocht naar andere patronen in de hersengolven die samenhangen met executief functioneren van de ratten. De te behalen resultaten zullen meer inzicht verschaffen in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van ratten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat verstoring van het executief functioneren bij verschillende ziektebeelden optreedt. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de interactie van de verschillende hersengebieden betrokken bij executief functioneren kan leiden tot de ontwikkeling van effectievere medicatie of andere interventies. De DEC acht het vergaren van kennis omtrent de signaaltransductie tussen hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring met het analyseren van elektrofysiologische data. De gekozen aanpak leidt tot meer inzicht in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden die behoren bij het executief netwerk, en de rol van de neurotransmitters dopamine en serotonine daarin.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de operatie waarmee elektrodes, optische fibers, virus en/of canules worden aangebracht in de hersenen. Het ongerief als gevolg van de gedragsexperimenten, van de water- of voedselrestrictie, en van het doden onder anesthesie door perfusie met paraformaldehyde schat de DEC in als licht. De commissie schat het ongerief als gevolg van de hersenoperatie onder anesthesie met adequate pijnbestrijding, en als gevolg van de langdurige solitaire huisvesting in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 95% van de ratten, en licht voor de overige ratten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De signaaltransductie in hersengebieden is dermate complex dat zij nog niet bestudeerd kan worden met computersimulaties. Dit onderzoek draagt wel bij aan het maken van dergelijke computermodellen, die het gebruik van proefdieren zouden kunnen verminderen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met de beschreven proefopzet en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Per dier worden veel data van verschillende hersengebieden verkregen op verschillende tijdstippen, waardoor er in totaal minder dieren nodig zijn. De verkregen data zullen beschikbaar zijn voor andere onderzoekers. In een pilot met 30 dieren zullen de onderzoekers ervaring opdoen met de operatietechniek en de gedragsexperimenten, waardoor variatie in de data door onervarenheid of het gebruik van minder goed ontworpen gedragsexperimenten wordt voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 366 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Door het aanbrengen van de headpost kunnen de dieren niet met soortgenoten gehuisvest worden. De dieren kunnen elkaar wel zien en ruiken, waardoor zij niet geheel afgezonderd zijn. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van ratten, en de rol van dopamine en serotonine daarin. Het belang van meer inzicht in het functioneren van het executief netwerk acht de DEC substantieel, omdat het executief functioneren van patiënten met verschillende neurologische of psychologische ziektebeelden is verstoord. Op termijn kan dit onderzoek bijdragen aan effectievere medicatie of andere interventies voor deze aandoeningen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 5% van de dieren licht ongerief en 95% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de hersenoperatie en de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016482

Bijlagen

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016482. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB [REDACTED] NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 18 april 2016
Geplande einddatum: 18 april 2021
Titel project: Neural synchronization and executive functions
Titel niet-technische samenvatting: Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

18 maart 2016

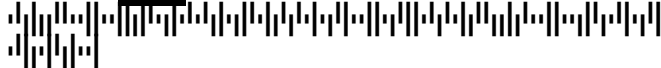


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB [REDACTED] NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016482

Bijlagen

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700482

Ordernummer: 040823-461220/ 2015-0129/ [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016482	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016482
Bijlagen
1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft het gebruik van alleen mannelijke dieren in de dopamine experimenten verder uitgelegd. Op 15 april 2016 heeft u een nieuwe versie van uw NTS naar ons toe gestuurd, waarin het ongerief classificatie aangepast is.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. In de aanvraag zijn er geen duidelijk beslismomenten en de criteria daarvoor opgenomen. De voorwaarde over de go/no-go momenten is gesteld om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt in het geval dat in een eerdere fase van het onderzoek blijkt dat de verwachte resultaten niet worden gehaald.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, sublid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel.

U kunt met uw project "Neural synchronization and executive functions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 18 april 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met de aanvullingen zoals hierboven gemotiveerd.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 18 april 2021, voor het project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 18 maart 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 15 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Description of procedures for surgery and tasks.	Ratten (Rattus norvegicus) / Sprague Dawley; Wistar; 5HTT KO; ThCre	366	95,00% Matig 5,00% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Specifieke voorwaarde:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat na de pilotexperimenten met de IvD wordt afgestemd wel dan niet het project verder uit te voeren, en dat de eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Algemene voorwaarde:

In artikel 10, sublid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
- Change of rat strain from TH-CRE/WT Sprague Dawley to TH-CRE/WT Long Evans. In the CCD application we have made a mistake by writing down the wrong background of the animal strain. We would like to change this to the correct strain background, namely Long Evens instead of Sprague Dawley.

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 26 . 04 . 2016
- Einddatum 18 . 04 . 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neural synchronization and executive functions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 02 - 06 - 2016

Handtekening [REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

[Redacted]
Postbus 9101,
6500 HB [Redacted] NIJMEGEN
[Barcode]

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016482-1

Uw referentie

Bijlagen

Datum 2 juni 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Melding projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted],

Wij hebben op 2 juni 2016 een melding ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482, waarvoor op 26 april 2016 een vergunning is afgegeven. Uw melding is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD103002016482-1.

U geeft aan een andere dan in de aanvraag vermelde rattenlijn te willen gebruiken: TH-CRE/WT Long Evans in plaats van TH-CRE/WT Sprague Dawley. De beschreven aanpassing aan het project leidt niet tot een toename van het aantal dieren en/of de mate van ongerief zoals beschreven in de oorspronkelijke aanvraag.

Deze melding volstaat. U mag de in de melding beschreven aanpassingen doorvoeren en verder gaan met de uitvoer van het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.