

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20173084	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x		x	
8	DEC-advies				x		x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
11	Reactie aanvulling aanvraag				x		x		
12	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x		



23 AUG. 2017

## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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 11200 <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>Vrije Universiteit te Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td rowspan="5"></td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> </tr> <tr> <td>1.3</td> <td>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></td> <td> <table border="1"> <tr> <td>IBAN</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td></td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td>1.4</td> <td>Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</td> <td> <table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5"></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td>1.5</td> <td><i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</td> <td> <table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table> </td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	Straat en huisnummer	Postbus	Postcode en plaats	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>IBAN</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td></td> </tr> </table>	IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer		1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5"></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres	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> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam																																						
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																																							
KvK-nummer																																							
Straat en huisnummer																																							
Postbus																																							
Postcode en plaats																																							
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>IBAN</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td></td> </tr> </table>	IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer																																		
IBAN																																							
Tenaamstelling van het rekeningnummer																																							
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5"></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres																															
(Titel) Naam en voorletters																																							
Functie																																							
Afdeling																																							
Telefoonnummer																																							
E-mailadres																																							
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> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres																												
(Titel) Naam en voorletters																																							
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 |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 01-01-2018
- Einddatum | 31-12-2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De structuur en functie van corticale netwerken
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
	<input type="checkbox"/> Wijziging € Lege
4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
	<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur Inkoopordernummer: WBS-element R/000139.01
	Factuuradres: Invoice@vu.nl
	Vrije Universiteit Amsterdam F&A/FSC/BA HG 1E-20 Ref: 2900/Beta De Boelelaan 1105 1081 HV Amsterdam
	Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

## 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 1.7). 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	13 f functionaris (Proefdierdeskundige)
Plaats	Amsterdam
Datum	21-08-2017
Handtekening	[Redacted]



## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 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 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.



Onze neocortex is onderdeel van de grote hersenen en direct betrokken bij een grote verscheidenheid aan hersenfuncties zoals het verwerken van zintuiginformatie, het koppelen van zintuiginformatie aan beweging en het uitvoeren van hoger cognitief gedrag. Het bouwplan van de verschillende corticale gebieden lijkt in grote lijnen op elkaar, ondanks grote verschillen in uitvoerende taken. In alle gebieden zijn bijvoorbeeld corticale lagen van elkaar te onderscheiden, en zijn de celtypes die worden aangetroffen in grote lijnen vergelijkbaar. [REDACTED]

[REDACTED] Het snorhaarsysteem van de rat is een zeer goed en veelgebruikt model voor de somatosensorische cortex van mensen, waar informatie van bijvoorbeeld onze vingertoppen verwerkt wordt (de gevoeligheid van rat en mens voor zintuigstimulatie is gelijk en ook de anatomische opbouw toont veel overeenkomsten).

Het basisplan betreft corticale lagen waarin informatie aankomt (met name Laag 4) en lagen van waaruit informatie verzonden wordt naar volgende hersengebieden (met name Laag 5 en 6). Uiteindelijk zorgt de verzameling corticale celtypes voor het adequaat verwerken van informatie en het aansturen van relevant gedrag. Het is dan ook logisch dat veel hersenziektes hun oorsprong vinden in verstoorde functie van de neocortex. Enkele voorbeelden zijn ADHD, autisme, maar ook minder voor de hand liggende ziektes als Multiple Sclerosis, ziekte van Alzheimer of ziekte van Parkinson zijn te herleiden naar corticale dysfunctie. Een groot probleem voor de medische wereld is echter, dat het niet bekend is wat de functie is van individuele celtypes in gezonde hersenen en een stevig fundament ontbreekt dus voor een gedegen fundamenteel inzicht in de ziekte ten tijde van vermindering of verlies van hersenfuncties.

Er is inmiddels relatief veel bekend over de **structuur** van individuele celtypes in met name sensorische cortex en er wordt veel onderzoek gedaan naar corticale activiteit tijdens gedrag. Maar er is nog maar heel weinig kennis beschikbaar over de directe koppeling tussen de **functie** van corticale lagen en geïdentificeerde celtypes tijdens normaal gedrag. **Het hoofddoel van deze aanvraag is de fundamentele principes te ontrafelen waarop de corticale kolom en de individuele bouwstenen zich gedragen tijdens een 1) eenvoudige en 2) complexe gedragstaak.** Het hoofddoel is op te splitsen in meerdere subdoelen, die niet los van elkaar uitgevoerd kunnen worden.

Teneinde algemene principes te ontrafelen over het corticale circuit is het van groot belang de organisatorische principes van verschillende corticale gebieden in kaart te brengen, waaronder gebieden die bij hoger cognitief gedrag betrokken zijn. Dit betreft bijvoorbeeld de associatie cortex waar een brug tussen sensorische cortex (inkomende zintuiginformatie) en motor cortex (uitgaande motorische aansturing) wordt gelegd. Tenslotte wordt de sensorische en associatie cortex vergeleken met prefrontale cortex waar integratie plaatsvindt van een nog groter aantal verschillende informatiestromen. Het combineren van meerdere informatiestromen in de prefrontale cortex leidt uiteindelijk tot strategisch gedrag, dat in grote mate bijdraagt aan onze sociaal interactie en intelligentie. Aangezien de rekenkracht van de drie corticale gebieden verschillen, is het hoofddoel van deze aanvraag de kennis over de organisatorische principes (structuur en functie) van verschillende hersengebieden op cellulair niveau in kaart te brengen en te vergelijken. Daarnaast is het van groot belang om de complete structuur van individuele celtypes in kaart te brengen om inzicht te krijgen in de stroom van informatie door het corticale netwerk. In het verleden is de structuur van een groot aantal celtypes uit visuele en somatosensorische cortex in kaart gebracht (oa. Allen Brain Instituut), maar altijd op basis van dunne hersenplakjes (350  $\mu$ m) waarin slechts  $\sim 15\%$  van de oorspronkelijke axonale architectuur aanwezig is en

de rest afgesneden. In het huidige voorstel zal met een in vivo benadering 100% van de structuur in kaart gebracht worden in zowel associatie als prefrontale cortex.

**-Subdoel: het in kaart brengen van de functie van individuele corticale lagen en celtypes in uiteenlopende corticale gebieden tijdens eenvoudig en complex gedrag.**

Het onderzoek uit deze aanvraag borduurt voort op eerdere studies [redacted] met bijbehorende publicaties in gerenommeerde internationale tijdschriften als eerste en laatste auteur. Daarnaast is het onderzoek van deze aanvraag wetenschappelijk getoetst middels verschillende toegekende projectaanvragen.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het **hoofddoel** van dit project is fundamenteel inzicht te krijgen in de functie van individuele lagen en celtypes in verschillende gebieden ([redacted]) tijdens gestandaardiseerd gedrag. Dit gedrag betreft of het verwerken van zintuiginformatie (eenvoudige taak) of het maken van een afgewogen beslissing op basis van zintuiginformatie (complexe taak). De combinatie van gestandaardiseerd gedrag met state-of-the-art elektrofysiologische metingen in 3 verschillende hersengebieden zal leiden tot gedetailleerd inzicht in de organisatorische principes van de corticale kolom in deze hersengebieden en inzicht geven in de functies van corticale lagen en celtypes [redacted]

#### **Subdoel 1: gedetailleerde morfologische typering van celtypes.**

Ondanks het bestaan van grote databases met gepubliceerde morfologiën is onze huidige kennis over celtypes nog altijd zeer beperkt, omdat de kennis vooral opgedaan is aan dunne hersenplakjes waarbij een groot deel van de oorspronkelijke structuur afgesneden wordt. Een ander fundamenteel probleem bij deze experimenten is het gebruik van jonge dieren (14-18 dagen oud) waardoor de beschreven structuur van hersencellen niet overeenkomt met de structuur zoals deze in volwassen hersenen wordt aangetroffen. Ten slotte zijn celtypes voornamelijk beschreven in visuele en somatosensorische cortex. Er is zodoende een hiaat in onze kennis over de complete structuur van specifieke celtypes in associatie en prefrontale cortex in volwassen hersenen.

Onze werkhypothese is dat de bouwstenen van corticale kolommen in verschillende hersengebieden in grote lijnen overeenkomen, maar dat de gedetailleerde structuur en functie van celtypes is afgestemd op het specifieke hersengebied. [redacted]

#### **Subdoel 2: bestudering van activiteit (=functie) van corticale lagen en celtypes tijdens eenvoudig gedrag.**

Het eenvoudige gedrag bestaat uit spontaan gebruik van de snorharen (whiskers) en betreft beweging en als resultaat, aanraking van een object. Dit gedrag is aangeboren en dus niet aangeleerd. Het gedrag wordt ook niet beloond, waardoor er geen associatie ontstaat met positieve/negatieve consequenties van dit gedrag. Het is van groot belang om corticale activiteit in [redacted] in kaart te brengen tijdens dit naïef gedrag, omdat deze metingen de functie van corticale lagen ontrafelen tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag.

[REDACTED]. Met de huidige aanvraag wordt toestemming gevraagd om de activiteit te onderzoeken van alle corticale lagen in drie relevante gebieden tijdens eenvoudig gedrag.

**Subdoel 3: bestudering van activiteit (=functie) van corticale lagen en celtypes tijdens complex gedrag.**

Het complexe gedrag bestaat uit een aangeleerde gedragstaak waarbij zintuiginformatie leidend is voor de rat om het aangeleerde en gewenste gedrag te vertonen (Figuur 3). De complexe gedragstaak is uitdagender voor de rat om uit te voeren en de werkhypothese is dan ook dat de verschillende relevante hersengebieden andere activiteit vertonen in vergelijking met de eenvoudige gedragstaak (subdoel 1).

**Subdoel 4: causaliteit tussen corticale activiteit en gedrag.**

Subdoelen 1 en 2 zullen een gedetailleerd beeld geven over de *correlatie* tussen neuronale activiteit in corticale lagen en celtypes en gedrag. Echter, om een *causaal* verband te kunnen leggen tussen gedrag en activiteit van corticale lagen of celtypes wordt in dit vierde subdoel neuronale activiteit in S1, PPC of PFC gemanipuleerd via optogenetische modulatie van individuele celtypes (activatie en/of remming van activiteit) om het causale verband met gedrag te kunnen kwantificeren.

**Haalbaarheid:**

[REDACTED]. Het team bestaat uit een toereikend aantal personen met de vereiste expertise om de huidige aanvraag succesvol uit te voeren. Er wordt gebruik gemaakt van state-of-the-art technieken en door middel van reeds toegekende geldaanvragen is de financiering voor het onderzoek gewaarborgd. De wetenschappelijke toetsing tijdens de geld-aanvragen geeft verder aan, dat dit onderzoek van zeer hoge kwaliteit is en dat er een bewezen wetenschappelijke noodzaak is voor de uitvoering hiervan.

[REDACTED]



---

[REDACTED]

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

#### Wetenschappelijk belang

Het wetenschappelijke doel op de korte termijn is het vergroten van de fundamentele kennis over de structuur en functie van verschillende corticale lagen tijdens eenvoudig en complex gedrag. Op de lange termijn zullen de onderzoeksresultaten kunnen bijdragen aan brein-machine interfaces (zoals het uitlezen van hersenactiviteit voor het aansturen van een elektronisch apparaat/neuroprothese).

#### Maatschappelijk belang

Corticale circuits zijn betrokken bij een uiteenlopend spectrum van cognitieve taken, zoals het verwerken van zintuiginformatie, het nemen van beslissingen of concentratievermogen. Verstoringen van de normale functie kan leiden tot veelvoorkomende ziektes als ADHD, PTSD en depressie. De behandeling bestaat doorgaans uit medicatie die verre van specifiek is voor individuele bouwstenen van het corticale circuit en medicatie is waarschijnlijk hierdoor niet altijd effectief, of kan leiden tot symptoomverergering en/of bijwerkingen. Ons standpunt is dat het cruciaal is om een gedetailleerd beeld te krijgen van de functie van corticale lagen en celtypes in het gezonde brein om vervolgens te kunnen bepalen waar verstoringen in het circuit optreden, die leiden tot hersenziektes. De kennis die uit deze aanvraag zal voortkomen zal een belangrijke stap voorwaarts zijn in onze kennis over de functie van individuele lagen en celtypes in 3 uiteenlopende corticale gebieden tijdens goed omschreven normaal gedrag. Met de fundamentele inzichten die hieruit voortkomen, zal op termijn wellicht de behandeling van veelvoorkomende hersenziektes te verfijnen zijn.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

De huidige vergunningsaanvraag is onderdeel van een langlopende onderzoekslijn waarbij de structuur en functie van individuele corticale neuronen wordt onderzocht. [REDACTED]

Het onderzoek is opgebouwd uit 4 onderdelen:

1) *morfologische reconstructie van neuronen in drie corticale gebieden, die betrokken zijn bij eenvoudig en complex gedrag.*

Met anatomisch onderzoek zullen we de dendritische en axonale architectuur digitaliseren en analyseren. Hiervoor gebruiken we *in vivo* kleuringen van individuele neuronen in verdoofde ratten en *ex vivo* histologie. De lengte en vertakkingsschema van individuele structuren zal in detail gekwantificeerd worden. De morfologiën worden geschaald naar anatomische kenmerken (pia en witte stof) zodat bekend is welke morfologiën in specifieke corticale lagen gevonden worden. De locatie van de elektrofysiologische metingen (subdoel 2-4) wordt bepaald aan de hand van histologische markerings (multi-unit elektrofysiologie) of aan de hand van dendritische reconstructie (single-unit elektrofysiologie). De resultaten uit subdoel 1 (structuur) en subdoelen 2-4 (functie van celtypes en corticale lagen) zal op deze manier gecombineerd kunnen worden en leiden tot nieuwe inzichten over de structuur en functie van individuele celtypes en specifieke corticale lagen.

2) *Onderzoeken welke corticale lagen in de drie relevante gebieden actief zijn tijdens eenvoudig gedrag.* Hiertoe wordt gebruik gemaakt van elektrofysiologische metingen in ratten, die aangeboren gedrag vertonen (spontaan, niet aangeleerd gedrag). De ratten zullen een operatie ondergaan waarbij een kleine opening in de schedel wordt gemaakt voor elektrofysiologische metingen. Na een herstelperiode van enkele dagen en gewenning aan kop-fixatie vertonen de ratten volledig natuurlijk gedrag. Tijdens dit natuurlijke, eenvoudige gedrag wordt de activiteit van verschillende corticale lagen in drie relevante hersengebieden bepaald.

3) *Onderzoeken welke corticale lagen in de drie relevante gebieden actief zijn tijdens een complexe, (aangeleerde) gedragstaak.* De ratten zullen een operatie ondergaan om elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. Na een herstelperiode van enkele dagen zullen de ratten gedurende enkele weken de gedragstaak aangeleerd worden. Dit bestaat uit een object, dat in een Go positie staat (relatief dichtbij) of in de No-Go (relatief veraf). De rat is afhankelijk van zijn snorharen om de positie te bepalen. In de Go positie kan de rat likken voor een waterbeloning. De rat mag niet likken wanneer het object in de No-Go positie staat. De activiteit in verschillende corticale lagen en hersengebieden zal bepaald worden ten opzichte van detectie-, keuze- en beloningsmomenten gedurende deze gedragstaak.

4) *Vaststellen wat en hoe de verschillende corticale lagen in de drie relevante hersengebieden bijdragen aan eenvoudig en complex gedrag.*

Uitkomsten van doel 2 en doel 3 zullen gebruik worden om gericht interventies uit te voeren op de activiteit van corticale lagen in verschillende hersengebieden om het causale verband tussen activiteit en gedrag te bepalen. [REDACTED]

[REDACTED]. Voor de interventie gebruiken we virussen die een eiwit tot expressie brengen in neuronen waarmee we deze neuronen kunnen stimuleren met licht (optogenetica, Yizhar *et al.*, 2011) We kunnen beginnen met de interventies tijdens eenvoudig gedrag voordat alle studies naar doel 3 zijn afgerond.

Ratten ondergaan een operatie waarbij virus wordt geïnjecteerd en de opening in de schedel maakt het mogelijk om elektrofysiologische metingen uit te voeren. Na een herstelperiode van enkele dagen (eenvoudig gedrag) tot enkele weken (complex gedrag) zullen de ratten de taak uitvoeren en zullen de corticale lagen op specifieke momenten (met milliseconde precisie) worden uitgeschakeld en het effect op elektrische activiteit bepaald worden. De combinatie van het opnemen van de neuronale activiteit en het moduleren van die activiteit tijdens gedrag zijn krachtige gereedschappen om de functie van corticale lagen aan te tonen.

---

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

---

### 1. Morfologie

Voor dit subdoel ondergaan de ratten een operatie waarbij onder diepe anesthesie een gat in de schedel geboord zal worden en een kleurstof geïnjecteerd zal worden in individuele neuronen. Na een paar uur zal de kleurstof door de cel verspreid zijn en zal het dier worden gedood en na *ex vivo* histologie worden de hersenen onderzocht voor anatomische doeleinden. De dendritische en axonale structuren van individuele celtypes worden vervolgens met sub(micrometer) resolutie gereconstrueerd. De positie van de gereconstrueerde cel wordt aan de hand van anatomische ijkpunten bepaald om uiteindelijk een realistisch computermodel te bouwen van het corticale microcircuit. De ontwikkeling en validatie van het realistische computermodel wordt in een internationale samenwerking gedaan.

### 2. Eenvoudig gedrag

Voor deze proefopzet ondergaan de ratten een korte habituatie-training (enkele dagen) om gewend te raken aan de onderzoeker. Vervolgens wordt een opening gemaakt over het te meten corticale gebied en een head-post op de schedel geplaatst (dag 0). Vervolgens wordt de rat getraind om te wennen aan het vastzetten van de kop. Gelijktijdig raakt de rat gewend aan de meetopstelling en zal de rat normaal gedrag vertonen tijdens head-fixatie. Wanneer de rat goed getraind is wordt de elektrofysiologische meting uitgevoerd en gelijktijdig het spontane gedrag opgenomen zodat de elektrofysiologische meting nauwkeurig aan gedrag gekoppeld kan worden. Aan het eind van de meting wordt door middel van *ex vivo* histologie de meetlocatie te bepaald. Het doel van deze (eenmalige) metingen is om de activiteit van corticale lagen en verschillende gebieden in kaart te brengen als de rat spontaan, aangeboren gedrag vertoont (niet aangeleerd).

---

### 3. Complex gedrag

Deze proefopzet betreft een aangeleerde gedragstaak en geeft zodoende inzicht in andere type hersenfunctie ten opzichte van subdoel 2.

Subdoel 3 betreft een trainingsfase waarin de ratten aangeleerd wordt de snorharen te gebruiken voor het bepalen van de positie van een object en gewenst gedrag te vertonen aan de hand van de positie van het object. Dit wordt aangeduid als de Go/No-Go taak. In vergelijking met de eenvoudige gedragstaak is de Go/No-Go een veel uitdagendere proefopzet. [REDACTED]

De ratten ondergaan op dag 0 een operatie voor het bevestigen van een head-post voor kopfixatie en het maken van een craniotomie om elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. Vervolgens ondergaan de ratten verschillende fases van training, om de ratten geleidelijk de gedragstaak aan te leren. Het trainingsschema is inmiddels bij verschillende ratten toegepast en loopt routinematig in het lab. De leercurves voor de gedragstaak (~30-60 dagen na operatie) vertonen variatie per rat, maar zijn goed voorspelbaar. Met de videobeelden is bevestigd, dat de ratten zowel tijdens de Go trials als de No-Go trials de snorharen gebruiken om de positie van het object te bepalen. Het doel van deze metingen is om de activiteit van corticale lagen en verschillende gebieden in kaart te brengen als de rat een complexe, aangeleerde gedragstaak vertoont. De vergelijking tussen corticale activiteit tussen eenvoudig en aangeleerd gedrag zal belangrijke inzichten verschaffen over de functie van individuele corticale lagen in verschillende hersengebieden.

#### Methode bij 2 en 3 is elektrofysiologie.

Het eenvoudige of complexe gedrag dient als cruciale factor voor het bestuderen van individuele corticale lagen of celtypes. Uiteindelijk is het gedrag een middel om de functie van individuele of populaties van neuronen te bepalen door middel van elektrofysiologische metingen. De functie van verschillende corticale lagen zal bestudeerd worden met behulp van multi-unit elektrodes waarmee de activiteit (actie potentiaal frequentie) van meerdere neuronen in verschillende corticale lagen tegelijk opgenomen kan worden. Deze multi-unit metingen zullen aangevuld worden met single-unit (loose-patch) afleidingen in combinatie met post mortem identificatie en reconstructie. De single of multi-unit electrode zal in het desbetreffende corticale gebied gepositioneerd worden via een kleine opening in de schedel en actie potentiaal frequentie zal offline gekwantificeerd worden in combinatie met gedragsanalyse. De single-unit afleidingen zijn eenmalig, de multi-unit elektrodes betreft metingen die herhaald kunnen worden per dier. De elektrofysiologische metingen leveren een schat aan informatie op over de activiteit van individuele en populaties neuronen tijdens de verschillende fases van eenvoudig en complexe gedragstaak.

#### 4. Optogenetische interventie.

De experimenten waarin eenvoudig of complex gedrag gecombineerd wordt met elektrofysiologie en/of neuronale reconstructies zullen zeer inzichtelijk zijn voor de **correlatie** tussen neuronale activiteit in specifieke corticale lagen en gedrag. Deze correlatie-experimenten zijn cruciaal om de corticale lagen te identificeren die betrokken zijn bij het uitvoeren van de gedragstaak. Om een direct **causaal** verband te kunnen leggen tussen activiteit in belangrijke lagen en gedrag zal er in dit laatste deel van de experimenten gerichte controle van neuronale activiteit plaatsvinden door middel van optogenetische interventie en zal het effect op gedrag gekwantificeerd worden. Er zal lokaal (in één hersengebied, één corticale laag) een virus geïnjecteerd worden dat in de opeenvolgende weken leidt tot de expressie van een lichtgevoelig kanaal in de excitatoire neuronale populatie (pyramidaal neuronen), dat bij activatie door een LED leidt tot remming van activiteit. Deze optogenetische interventie geeft de mogelijkheid om met milliseconde-resolutie een specifieke corticale laag "uit" te zetten. Deze benadering zal gecombineerd worden met de gedragstaken ten einde een causaal verband te kunnen leggen tussen neuronale activiteit in individuele corticale lagen (en/of celtypes) en het uitvoeren van de taken. De correlatie-experimenten zullen inzicht geven in de corticale lagen die betrokken zijn bij de detectie-, keuze- en beloningsmomenten. De optogenetische interventie zal toegepast worden op basis van de eerder opgedane kennis over de tijdstippen waarop specifieke lagen actief zijn tijdens eenvoudig en

complex gedrag.

Tijdens de experimenten zal een LED gemonteerd worden aan de elektrode, zodat de optogenetische interventie online bevestigd kan worden. De eerder genoemde meetomstandigheden (elektrofysiologie en gedrag) zullen exact hetzelfde blijven en de metingen zullen herhaald worden in ieder dier. Na afloop van het experiment zal er post-mortem histologie uitgevoerd worden om de locatie van virusinfectie en dus optogenetische interventie te bevestigen.

### **Overzicht dierproeven:**

➤ Subdoel 1: Morfologie

- [REDACTED]

➤ Subdoel 2: Elektrofysiologie in combinatie met eenvoudig gedrag

- [REDACTED]

➤ Subdoel 3: Elektrofysiologie in combinatie met complex gedrag (Go/No-Go)

- [REDACTED]

➤ Subdoel 4: Manipulatie van gedrag door beïnvloeding van neuronale activiteit

- [REDACTED]

---

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

---

#### 1. Morfologie

Als eerste zal onderzocht worden wat de morfologische kenmerken zijn van celtypes in de corticale lagen van de drie hersengebieden, die relevant zijn voor de gedragstaken (Figuur 4). De morfologie experimenten geven inzicht in de structuur van individuele neuronen en de locatie van deze neuronen ten opzichte van de corticale lagen. Vervolgens zullen er elektrofysiologische metingen gemaakt worden in de corticale lagen voor de functionele identificatie van celtypes. De morfologie experimenten zullen zodoende voorspellend zijn voor het type cel dat gemeten kan worden in de verschillende corticale lagen. De morfologie experimenten hoeven niet afgerond te zijn op het moment dat de elektrofysiologie gestart wordt, aangezien het succes van de elektrofysiologie experimenten niet afhankelijk is van de morfologie experimenten.

#### 2. Elektrofysiologie in combinatie met eenvoudig gedrag.

De bijdrage van corticale lagen aan gedrag wordt allereerst bestudeerd tijdens spontaan, niet-aangeleerd gedrag. Dit deel van de experimenten geeft ons inzicht in de bijdrage van corticale lagen en celtypes aan eenvoudig, aangeboren gedrag. Er zal met name gekeken worden naar verschillen in de functie van hetzelfde celtype uit drie verschillende corticale gebieden. De volgende fase van het project is om de functie van dezelfde corticale lagen en celtypes in kaart te brengen tijdens complex, aangeleerd gedrag. De experimenten uit subdoel 2 zullen een eerste indicatie geven van belangrijke lagen bij eenvoudig gedrag. Deze lagen zullen geprioriteerd worden bij de metingen waarbij de functie van corticale lagen bestudeerd wordt tijdens aangeleerd, complex gedrag.

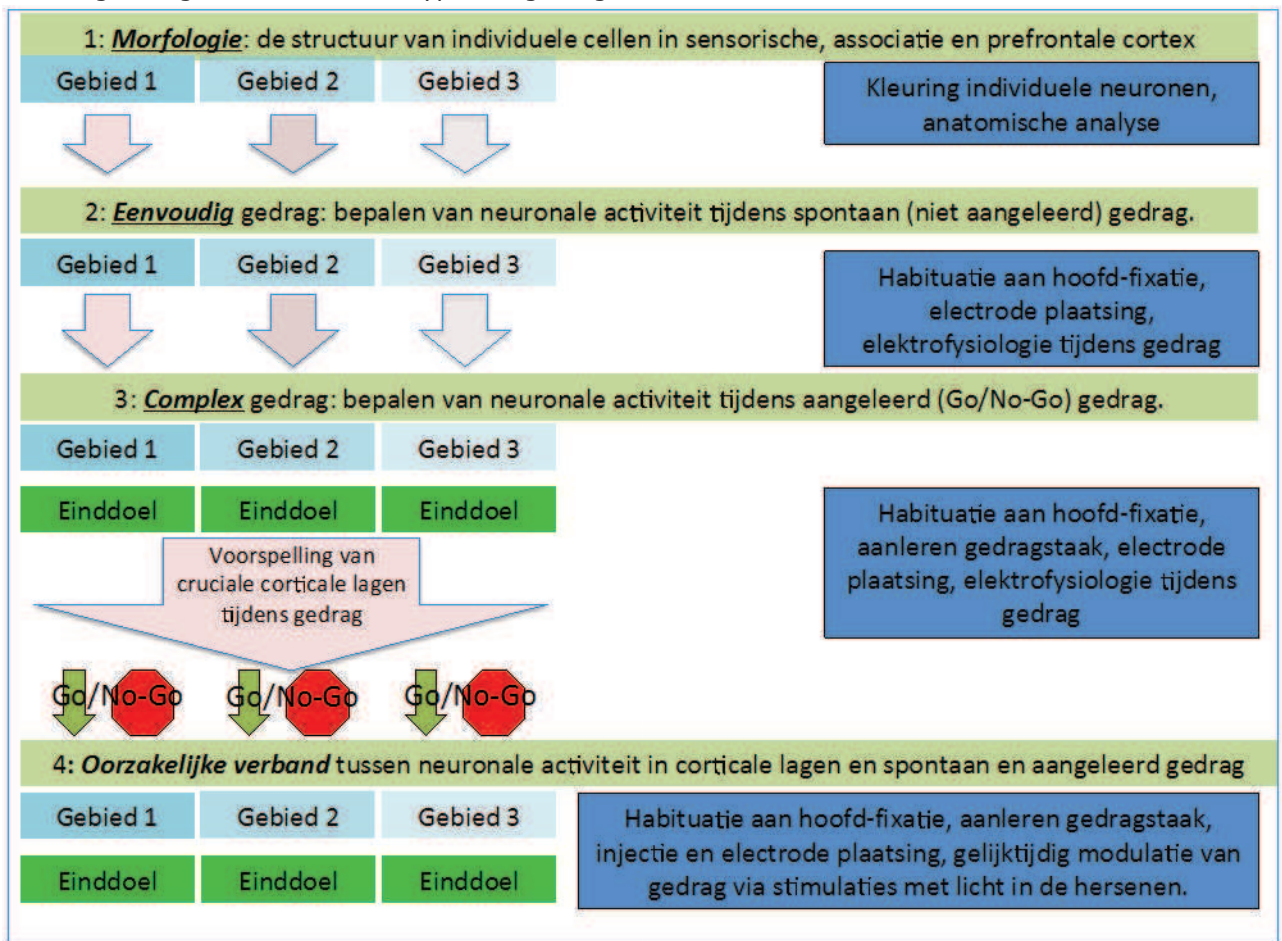
#### 3. Elektrofysiologie in combinatie met complex gedrag.

De kennis over de activiteit van corticale celtypes, lagen en gebieden tijdens eenvoudig, niet aangeleerd gedrag zullen de basis vormen voor de volgende fase in het project waarin de activiteit van dezelfde corticale celtypes, lagen en gebieden zal worden bestudeerd tijdens complex, aangeleerd gedrag. Dit complexe gedrag vereist de aandacht van de rat en de rat heeft geleerd dat gewenst gedrag leidt tot beloning. De complexe gedragstaak zal een grotere bijdrage eisen van de relevante hersengebieden en de verwachting is dan ook andere neuronale activiteit waar te nemen tijdens gedragsveranderingen. Ook bij dit subdoel zullen de morfologische reconstructies voorspellend zijn voor de celtypes die

elektrofysiologisch beschreven worden tijdens aangeleerd gedrag. Tijdens de analyse van neuronale activiteit zal er met name gekeken worden naar veranderingen in activiteit tijdens detectie-, keuze- en beloningsmomenten.

#### 4. Manipulatie van neuronale activiteit en het uitlezen van het effect op gedrag.

De interventie experimenten zullen gestart worden zodra bekend is welke corticale lagen in de verschillende hersengebieden een robuuste correlatie laten zien tussen veranderingen in activiteit en eenvoudig/complex gedrag. De interventie experimenten zullen vervolgens gericht worden op de lagen waar de grootste absolute of relatieve veranderingen waar te nemen zijn in relatie tot detectie-, keuze- en beloningsmomenten (Go-moment in project). Er zullen geen interventie experimenten uitgevoerd worden aan lagen, die geen verandering in activiteit lieten zien tijdens eenvoudig of complex gedrag (No-Go moment in project). Door toepassing van optogenetische interventie op specifieke momenten van de taak is het mogelijk de neuronale activiteit te remmen en het gedrag te beïnvloeden. Er zal op deze manier een direct oorzakelijk verband aangetoond kunnen worden tussen activiteit van morfologische geïdentificeerde celtypes en gedrag.



Figuur 4: Opbouw van overkoepelende project met samenhang tussen subdoelen en Go/No-Go momenten. De subdoelen 1. Morfologie, 2. Eenvoudig gedrag, 3. Complex gedrag en 4. Oorzakelijk verband. De project onderdelen worden toegelicht in de verschillende bijlagen van het projectvoorstel.

#### 3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

1	Morfologie
2	Eenvoudig gedrag
3	Complex gedrag
4	Optogenetische interventie
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project *Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden*
- 1.2 Looptijd van het project 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) cortex/corticale netwerken, hersengebieden

## 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
- 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)
- De hersenschors (cortex) is onderdeel van onze grote hersenen en betrokken bij een groot aantal hersenfuncties, zoals het nemen van beslissingen, het bewust verwerken van zintuiginformatie of het coördineren van bewegingen. Onze cortex is onderverdeeld in deelgebieden met ieder een eigen onderliggende taak, maar het is niet bekend hoe de organisatorische eigenschappen van corticale deelgebieden van elkaar verschillen en welke verschillen bijdragen aan het uitvoeren van specifieke hersenfuncties.
- Het corticale netwerk is opgebouwd uit verschillende bouwstenen (de hersencellen), en de verschillende bouwstenen zijn van elkaar te onderscheiden op basis van specifieke kenmerken op het gebied van structuur (morfologie) en functie (elektrische activiteit).

De vraag die centraal staat in het huidige project is:

*“Wat zijn de kenmerken van de individuele bouwstenen (structuur en functie) waaruit verschillende corticale gebieden zijn opgebouwd.”*

Binnen dit project zullen de structuur en functie van individuele bouwstenen worden onderzocht in drie hersengebieden die betrokken zijn bij verschillende hersenfuncties. [REDACTED]

Het uiteindelijke doel van dit project is om fundamentele kennis te vergaren over de overeenkomsten en verschillen in structuur en functie van de bouwstenen uit verschillende corticale gebieden. Dit zal de basis zijn voor het formuleren van algemene bouwprincipes waarmee corticale netwerken worden opgebouwd en uiteindelijk functioneren. Dit is een cruciale stap in het proces om betere behandelingen te ontwikkelen bij hersenziektes waarbij de corticale functies zijn verminderd, zoals ziekte van Alzheimer, ziekte van Parkinson, autisme of ADHD.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project heeft op korte termijn voornamelijk een fundamenteel wetenschappelijk karakter en heeft als doel de kennis over de structuur en functie van verschillende corticale celtypes, lagen en gebieden te vergroten. De maatschappelijke toepassingen van de vergaarde kennis kunnen dan op de lange termijn worden gerealiseerd. Met de kennis over individuele bouwstenen in verschillende deelgebieden van het gezonde brein ontstaan er nieuwe mogelijkheden om hersenziektes te bestuderen om zo betere therapeutische behandelingen of meer doelgerichte medicatie te ontwikkelen om hersenfuncties te herstellen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Bijlage 1 (morfologie): 120  
Bijlage 2 (eenvoudig gedrag): 285  
Bijlage 3 (complex gedrag): 137  
Bijlage 4 (optogenetische interventie): 81

In totaal worden maximaal 623 ratten in dit project gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Alle ratten zullen een operatie ondergaan. Een deel van de ratten zal onder anesthesie blijven tijdens de procedure en niet ontwaken (terminaal ongerief). Ratten die ontwaken om aan gedragstaken deel te kunnen nemen, ondervinden matig ongerief als gevolg van de operatie, met name tijdens het ontwaken en herstel. Daarnaast worden de wakkere dieren met het hoofd vastgezet in een proefopstelling. Dit zogenaamde fixeren geeft vooral in de eerste paar sessies stress en ongerief, maar ratten wennen hier gauw aan. Een deel van de dieren zal ook tijdens dit fixeren beperkt water krijgen om hun gedrag tijdens het onderzoek te sturen door middel van beloning (met water). Dit zorgt bij de dieren voor voldoende motivatie om de dagelijkse behoefte aan water te verdienen met het uitvoeren van de gedragstaak. De ratten raken zeer snel gewend doordat alle procedures zijn gestandaardiseerd, de tijden van het trainingsschema voorspelbaar zijn en ze worden beloond na afloop van fixatie. Door de beloning ontstaat een positieve associatie met de onderzoeker en alle ratten vertonen na verloop van enkele dagen gedrag dat niet meer te onderscheiden is van ratten, die vrij rond bewegen.

- |   |  |
|---|--|
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Bij 20% van de dieren is er sprake van terminaal ongerief en bij 80% van de dieren is er sprake van maximaal matig ongerief. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?                               | De ratten worden na de proeven gedood om de structuur van de corticale hersencellen met een microscoop te kunnen bestuderen. |

## 4 Drie V's

- |  |   |
|--|---|
| 4.1 <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.     | <p>Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de zintuigsystemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij horende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het zintuigorgaan als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen bij een levend dier worden uitgevoerd. Zeer basale vraagstukken (zoals morfologische eigenschappen van individuele hersencellen) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier worden uitgevoerd bij het verdoofde dier om het ongerief zoveel mogelijk te beperken.</p> <p>Er bestaan tot nu toe geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die aandacht kunnen simuleren of op een biologisch relevante manier informatieverwerking in corticale netwerken kunnen nabootsen. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er intussen wel een samenwerking opgezet met makers van computermodellen die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren. Recent zijn de eerste eenvoudige vraagstellingen met behulp van het model onderzocht en beantwoord zonder gebruik te hoeven maken van proefdieren. Het computermodel zal doorlopend uitgebreid en verbeterd worden met als doel dierproeven te verminderen of in enkele gevallen zelfs te vervangen.</p> |
| 4.2 <b>Vermindering</b><br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.   | Bij het onderzoek passen wij statistische methodes toe om te voorkomen dat er teveel dieren worden gebruikt. Dit doen wij met onze proefopzet met o.a. 1) meerdere metingen per dier, 2) parallele metingen van meerdere hersencellen voor hoge opbrengst van aantal metingen per dier en 3) herhaalde metingen in de tijd die erop is gericht een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van onze onderzoeksvraag. Als de gehoopte resultaten van de experimenten hoger blijken dan bij aanvang van het onderzoek ingeschat, zullen niet alle dieren worden gebruikt.   |
| 4.3 <b>Verfijning</b><br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Het doel van het onderzoek is om de structuur en functie van corticale bouwstenen te karakteriseren en meer inzicht te krijgen in het aansturen van gedrag door verschillende corticale hersengebieden. Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden bij eenvoudige organismen zoals fruitvliegen en slakken, omdat deze dieren niet beschikken over een soortgelijke cortex. Aangezien we met dit onderzoek fundamentele aspecten van intelligent gedrag en onderliggende hersennetwerken bij mensen willen onderzoeken, is het enige alternatief één van de meest geschikte modeldieren, namelijk   |

de rat. [redacted]  
[redacted]  
[redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted]  
[redacted]  
[redacted] Zeer ervaren onderzoekers voeren het onderzoek uit, en zij maken daarbij gebruik van gestandaardiseerde en geoptimaliseerde procedures om de omstandigheden tijdens het onderzoek stabiel te houden en de resultaten van verschillende metingen onderling vergelijkbaar te maken.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Het project richt zich op de organisatorische kenmerken van corticale circuits. Om dit te kunnen onderzoeken, hebben we elektrofysiologische metingen nodig van hersencellen tijdens het uitvoeren van een gedragstaak. Dit betekent dat de rat wakker en alert moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment uitgebreid getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken. Alle handelingen worden te allen tijde uitgevoerd door gekwalificeerd en zeer ervaren personeel. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. Voordat meer dan matig ongerief optreedt worden de humane eindpunten toegepast. In de praktijk komt dit maar bij <1% van de experimenten voor. Tenslotte zijn de trainingen voorspelbaar en verblijven de ratten een kooi die verrijkt is met geschikt nestmateriaal, speeltjes en een huisje, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag kunnen blijven voortzetten.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum	<input type="text"/>
Beoordeling achteraf	<input type="text"/>
Andere opmerkingen	<input type="text"/>



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Morfologie

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Vraagstelling: wat zijn de morfologische kenmerken van individuele bouwstenen (hersencellen) in verschillende corticale hersengebieden?

Uitkomstparameters: individuele hersencellen zullen worden gevuld met een kleurstof, zodat deze hersencellen na histologische kleuring digitaal gereconstrueerd kunnen worden. Dit levert zeer gedetailleerde informatie op over de dendritische en axonale architectuur, zoals lengte (in micrometer), aantal vertakkingen, locatie van vertakking, aantal primaire dendrieten, en lengte van individuele segmenten (in micrometer). De reconstructie zal worden geschaald naar een gestandaardiseerd referentiekader, zodat de positie bepaald kan worden in het netwerk en werkhypothesen kunnen worden ontwikkeld over de input/output verbindingen op basis van dendritische en axonale morfologie.

De procedure betreft een kleuring van individuele neuronen in verdoofde ratten. [REDACTED]

[REDACTED]. De biocytine kleuring is relatief eenvoudig onder stabiele meetomstandigheden (in verdoofde ratten), maar is zeer uitdagend in wakkere dieren vanwege de relatief instabiele meetomstandigheden. De ervaring leert dat biocytine kleuringen in wakkere, alerte dieren voldoende is voor reconstructie van de dendritische architectuur, maar stabielere omstandigheden zijn nodig voor het succesvol kleuren van de dunnere axonen, omdat meer kleurstof in de cel geïnjecteerd dient te worden. Een deel van de morfologie experimenten van het overkoepelende project zal om deze reden aan diep verdoofde dieren worden uitgevoerd om de volledige structuur van individuele neuronen in kaart te kunnen brengen (cellichaam, dendrieten, axon).

Deze methode heeft geleid tot zeer gedetailleerde informatie over de structuur van individuele bouwstenen

[REDACTED]. Om de resultaten maximaal vergelijkbaar te maken voor de drie corticale gebieden wordt wederom bewust gekozen voor biocytine kleuring van individuele neuronen in systemisch verdoofde ratten. Gezien de hoge mate van standaardisatie van de procedure zal in alle gevallen biocytine gebruikt worden als kleurstof.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De dieren worden normaal gehuisvest tot de start van het experiment. Er zal inhalatie anesthesie worden gebruikt om de dieren in een roes te brengen, en systemische anesthesie om een algehele narcose te bewerkstelligen.

Ter aanvulling van de systemische narcose wordt tijdens de operatie uit voorzorg lokale anesthesie toegepast.

De experimenten duren maximaal 6 uur (gerekend vanaf inhalatie anesthesie tot uiteindelijke doden van het dier voor ex vivo histologie).

#### Experimentele procedure

Er zal een kleine opening in de schedel gemaakt worden om een extracellulaire afleiding te maken van één enkele cel en vervolgens zal de cel gevuld worden met biocytine om de cel post mortem te kunnen identificeren en reconstrueren. Het brein zal in secties van 100 µm gesneden worden voor de identificatie en reconstructie van de gekarakteriseerde cel.

Per dier zal één neuron gekleurd worden voor de digitale morfologische reconstructie. Deze benadering is een arbeidsintensieve benadering, maar omdat intracorticale projecties zeer complex zijn, is het niet mogelijk meerdere cellen per dier te kleuren voor reconstructie. Wanneer meerdere neuronen in hetzelfde dier gekleurd worden, is het niet mogelijk betrouwbaar de (seriële) reconstructies te maken.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

De experimenten zullen zich richten op projectie neuronen [REDACTED], [REDACTED] [REDACTED]. In laag [REDACTED] zijn twee dominante type (excitatoire) output cellen aanwezig: 1) simpele 5A cellen en 2) complexe 5B cellen. De simpele cellen projecteren naar het striatum en motor cortex en de complexe cellen projecteren naar verschillende sub-corticale gebieden (oa. de thalamus of de pontine nuclei in de hersenstam). [REDACTED]. [REDACTED]. [REDACTED].

Dit betekent vier experimentele groepen (oftewel 4 celtypes):

1. [REDACTED]  
[REDACTED]
- [REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED].



In de overige experimenten zal de biocytine kleuring voldoende zijn voor reconstructie van de dendrieten, maar onvoldoende zijn voor reconstructie van het axon. Deze experimenten zullen dan gebruikt worden om ons computermodel verder uit te bouwen. Op deze manier zullen de dieren voor meerdere projecten gebruikt kunnen worden.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal: 120, leeftijd: 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

Een gedetailleerde kwantificatie van structuur heeft aangetoond dat de anatomische kenmerken van het somatosensorische (snorhaar) systeem in de cortex significant verschilt tussen mannetjes en vrouwtjes. Daarnaast is aangetoond dat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. De gedragstaak gaat uit van informatieverwerking in dit systeem en de Go/No-Go taak moet worden uitgevoerd met behulp van somatosensorische informatie. Er zullen dus alleen mannetjes worden gebruikt in de experimenten van bijlage 1-4 om uit te sluiten dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden, kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

. Naar alle waarschijnlijkheid is het zodoende niet mogelijk betrouwbare conclusies te kunnen trekken met slechts  $n = 5$  per type in PFC of PPC. Een veilige schatting is om uit te gaan van 10 reconstructies in plaats van 5 reconstructies per celtype voor de vergelijking. Hierbij moet aangegeven worden dat er minder reconstructies gemaakt zullen worden mochten de uiteindelijke verschillen prominent genoeg zijn om de analyse met minder reconstructies te doen. Wanneer wordt uitgegaan van 10 reconstructies per celtype, zullen er  $4 \times 10 = 40$  cellen nodig zijn. Aangezien 1 op de 3 experimenten succesvol is, betekent dit  $40 \times 3 = 120$  dieren.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

### Vervanging:

De organisatorische principes van corticale gebieden kan het best bestudeerd worden in een experiment waarin individuele neuronen intact zijn, dus in vivo, in het levende dier. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier, worden in het verdoofde dier uitgevoerd om mogelijk ongerief te beperken. Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders

dan de levende diermodellen, om een dergelijke onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Ook bestaan er geen computermodellen die de vraagstellingen zouden kunnen beantwoorden. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met programmeurs die gebruik maken van de resultaten met verdoofde dieren om tot een computermodel van het corticale circuit te komen.

Deze samenwerking betreft het ontwikkelen van een computermodel, dat de morfologie én de elektrische activiteit beschrijft van de somatosensorische cortex. Dit model is volledig gebaseerd op de experimenten aan verdoofde dieren en zal in de toekomst kunnen dienen voor het verfijnen of zelfs vervanging van experimenten. Deze vergunningsaanvraag over de organisatorische kenmerken van corticale gebieden zal naadloos aansluiten op ons eerdere werk, en de nieuwe onderzoeksgegevens zullen dan ook direct bijdragen aan het verbeteren en aanvullen van het computermodel met belangrijke nieuwe gegevens.

**Vermindering:**

Onze ervaring met soortgelijke experimenten [REDACTED] heeft geleid tot een optimale strategie met een helder doel voor ogen en een duidelijke focus op de belangrijke parameters die gekwantificeerd moeten worden per reconstructie. Statistiek zal vervolgens gebruikt worden om te voorkomen dat meer dieren gebruikt worden dan nodig.

**Verfijning:**

De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. Dit wordt gegarandeerd door middel van algehele verdoving tijdens gehele experiment en lokale pijnbestrijding. De ratten worden voorafgaand aan de ingrepen gehuisvest in verrijkte kooien.

---

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

---

Voorafgaand aan het experiment worden de dieren in paartjes en in verrijkte kooien gehuisvest. Het experiment wordt gestart met inhalatie anesthesie en vervolgens blijven de dieren gedurende het verdere verloop van het experiment onder algehele verdoving. De kans op pijn, lijden en/of angst bij de dieren wordt zodoende geminimaliseerd.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

---

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd, omdat de benodigde technische expertise doorgaans niet voorhanden is om de *in vivo* structuur van individuele cellen in kaart te brengen. Door onze leidende positie wereldwijd met deze expertise zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en zijn we exact op de hoogte waar hiaten in de kennis bestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek nu succesvol uit te kunnen voeren.

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

---

Nee

---

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

---

---

**G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

---

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

---

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

---

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

**H. Pijn en pijnbestrijding**

---

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

---

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding.

---

**I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

---

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

---

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

---

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

---

**J. Humane eindpunten**

---

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

---

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

---

**K. Classificatie van ongerief**

---

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

---

Er is sprake van een experimentele procedure onder totale verdoving.

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met speciaal ontwikkelde stereotactische apparatuur om ongerief zo veel mogelijk te beperken. Tijdens soortgelijke experimenten traden er nooit infecties op van het geopereerde gebied. Geen van de geopereerde dieren moest door complicaties voortijdig worden geëthanaseerd.

**Tabel 1:** Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	Category	Expected percentage of animals
1. Ingrepen en doden tijdens transccardiale perfusie onder verdoving.	terminaal	100%, > 5 min

cumulatieve ongerief: terminaal.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Het doden van het dier is essentieel om de *ex vivo* histologische kleuring mogelijk te maken voor de uiteindelijke morfologische reconstructie.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                                |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Eenvoudig gedrag"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Vraagstelling: wat is de functie van individuele corticale lagen en celtypes in verschillende corticale gebieden  tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag?

Uitkomstparameters: De ratten worden herhaaldelijk blootgesteld aan de meetopstelling en kop-fixatie om te wennen aan de omstandigheden en elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. De habituatie leidt ertoe dat de ratten na een aantal sessies gewend zijn aan de omstandigheden en natuurlijk gedrag vertonen. Dit gedrag bestaat uit het spontaan en vrijwillig heen en weer bewegen van de snorharen om de omgeving te verkennen. Dit eenvoudige gedrag (snorhaargebruik en als resultaat contact met object) wordt opgenomen met een snelle camera en gecombineerd met elektrofysiologische metingen van individuele of groepen neuronen. In geval van single-unit metingen wordt de gemeten cel met biocytine gevuld voor post mortem identificatie en reconstructie. De positie van multi-unit metingen wordt vastgesteld aan de hand van een fluorescente markering op de meetlocatie. De combinatie van 1) gedrag, 2) elektrofysiologie en 3) identificatie van corticale laag/celtype geeft de mogelijkheid om actie potentiaal frequenties in verschillende corticale gebieden zeer nauwkeurig te correleren aan eenvoudig, aangeboren gedrag.

De aanpak om de functie van corticale lagen in verschillende gebieden tijdens *eenvoudig*, natuurlijk gedrag te bestuderen is uniek, aangezien de conventionele aanpak is om dieren (muizen, ratten of zelfs apen) te trainen gewenst gedrag te vertonen. Het gewenste gedrag wordt vervolgens beloond en ongewenst gedrag gestraft, zodat het dier zijn acties gaat aanpassen om de beloning te maximaliseren. Echter, onder deze omstandigheden is het niet uit te sluiten dat 1) corticale activiteit verandert onder invloed van het aanleren van de gedragstaak; 2) het gedrag wordt aangepast om de taak zo goed mogelijk uit te voeren en tenslotte, 3) neurotransmitter circuits in de cortex (zoals dopamine) geactiveerd worden als gevolg van de beloning en invloed hebben op de actiepotentiaal patronen, die gemeten worden. Er is dus heel bewust gekozen om in

dit deel van de aanvraag corticale activiteit en functie van lagen/celtypes te bestuderen tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag waarbij de hiervoor genoemde processen geen rol spelen.

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De dieren zullen individueel gehuisvest worden in verrijkte kooien (huisje, speeltjes en nestmateriaal om de leefomstandigheden te optimaliseren) met voedsel en water *ad libitum*. Na trainingssessies zullen de ratten een speciale voedselbeloning krijgen.

De operatie wordt onder algehele inhalatie narcose uitgevoerd. Ter aanvulling en uit voorzorg wordt lokale pijnbestrijding gebruikt. Tijdens de operatie wordt op de schedel een kleine, solide metalen cilinder bevestigd, die het mogelijk maakt de kop te fixeren. Daarnaast wordt een plastic, holle cilinder aangebracht bovenop het corticale gebied waarvan gemeten zal worden ([redacted]). Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken en vervolgens de opening te beschermen door het afsluiten van de cilinder met de schroefdop. Op de dag van het experiment (dag 5) wordt de schroefdop verwijderd om toegang te krijgen tot de opening.

De totale tijdsduur van de operatie is ongeveer 2 uur, waarna de rat geleidelijk en vanzelf zal ontwaken.

Gedurende de dagen na de operatie (dag 1 – 4, gewenning fase) zal de rat tweemaal daags getraind worden om gewend te raken aan kop-fixatie en de experimentele omstandigheden. Dit houdt in dat de rat in de stereotax wordt geplaatst en de kop gefixeerd. De rest van de rat wordt niet vast gezet tijdens het experiment. Om stress zoveel mogelijk te reduceren, zal het dier onder een oppervlakkige roes met inhalatie anesthesie gebracht worden om het plaatsen in de stereotax te vergemakkelijken. De duur van de kop-fixatie zal aanvankelijk slechts 5 min zijn, maar gedurende de daarop volgende trainingssessies zal dit opgevoerd worden naar 25 min. Tijdens het uiteindelijke experiment zal de rat in de stereotax geplaatst worden voor de elektrofysiologische meting van neuronale activiteit en verwerking van zintuiginformatie.

[redacted]. Dit wordt, voorafgaand aan het wakkere dier experiment, in het verdoofde dier bepaald door de corticale response op mechanische beweging van de snorharen te meten. Vervolgens wordt de inhalatie verdoving stopgezet, waarna de rat wakker wordt en de neuronale activiteit gemeten kan worden tijdens normaal gedrag (actieve beweging van de snorharen en object touch). Tijdens de elektrofysiologische meting zal de beweging van de snorharen opgenomen worden met een snelle camera.

In geval van een single unit meting zal na de fysiologische karakterisatie de cel gevuld worden met biocytine voor post mortem identificatie. Bij multi-unit metingen zal post mortem de locatie van de meting vastgesteld worden aan de hand van een fluorescente markering. Aan het eind van het experiment (het uiteindelijke experiment duurt maximaal 60 min) zal het dier onder systemische narcose gebracht worden voor perfusie. Het brein zal in secties van 100  $\mu\text{m}$  gesneden worden voor de identificatie en reconstructie van de gekarakteriseerde cel of vaststelling van meetlocatie.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]



[REDACTED]

[REDACTED] )  
Dit project richt zich op laag 4, 5A en L5B met de wens  $\pm 10$  geïdentificeerde cellen per groep te hebben om betrouwbare statistiek uit te voeren. [REDACTED].

[REDACTED]

[REDACTED] Wij willen twee types experimenten doen, waarbij we tegelijk óf in dezelfde laag van alle drie de subgebieden, óf in alle drie de lagen van hetzelfde subgebied afleidingen doen. In eerdere publicaties van andere laboratoria die experimenten met een enkele tetrode hebben gedaan, zijn 20-30 ratten per experimentele groep gebruikt. Onze experimenten zijn echter technisch uitdagender doordat wij meerdere tetrodes plaatsen, waardoor de kans op het niet-optimaal geplaatst zijn van één van de tetrodes groter is en de data van het experiment niet volledig gebruikt kunnen worden. Daarentegen denken wij ook dat door de dubbele sampling van elke laag in elk subgebied (eenmaal tegelijk met andere lagen in hetzelfde subgebied en eenmaal met dezelfde laag in andere subgebieden) wij het aantal dieren per groep kunnen terugbrengen tot 15, zonder te verliezen aan statistische significantie.

De getallen worden met de IvD afgestemd en er zal gebruik gemaakt worden van de Mann-Whitney of t-test voor vergelijkingen tussen celtypes en de ANOVA test voor vergelijkingen tussen dezelfde celtypes van meerdere hersengebieden.

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal 285 [REDACTED], 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

[REDACTED]

De metingen zullen aan de 5 verschillende lagen in de cortex worden verricht voor [REDACTED]. Voor betrouwbare statistiek aan fysiologische eigenschappen (Mann-Whitney of t-test) zijn  $\pm 10$  (geïdentificeerde) cellen nodig per groep. Dit resulteert in 2 (condities) x 1.5 (succesrate) x 10 (cellen) x 5 (lagen) = 150 dieren.

[REDACTED]

Dit project richt zich op laag 4, 5A en L5B met de wens  $\pm 10$  geïdentificeerde cellen per groep te hebben. Met een succesrate van 2 op 3 (67%) komt het aantal aangevraagde proefdieren op:  
3 celtypes x 10 cellen per celtype = 30 cellen, 1 cel per rat  
 $30 \times 1.5 = 45$

[REDACTED]

[REDACTED] Dit betekent dat we 3 (subgebieden) \* 2 (type meting) \* 15 = 90 dieren nodig hebben.

Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem, en de Go/No-Go taak (bijlage 3) uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort en leeftijd constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden kunnen fysiologische

en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### **Vervanging:**

Codering van sensorische informatie in het brein kan alleen bestudeerd worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn (in dit geval hersenstam, thalamus en sensorische cortex). Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstellingen (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier heb ik in het verleden altijd in het verdoofde dier bestudeerd om zoveel mogelijk ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Ook bestaan er geen computermodellen die de vraagstellingen zouden kunnen beantwoorden. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computer programmeurs die gebruik maken van de resultaten. Recent zijn de eerste computersimulaties gepubliceerd en het doel is om dit model te gebruiken voor het formuleren van gerichte hypothesen, hetgeen kan leiden tot vermindering, en op termijn wellicht tot vervanging van proefdieren.

#### **Vermindering:**

Per hersengebied wordt bepaald of single- of multi-unit elektrofysiologie de meest efficiënte benadering is voor het bereiken van de einddoelen met zo min mogelijk dieren. Op de data zal statistiek worden toegepast en niet meer dieren worden gebruikt dan noodzakelijk. Daarnaast wordt bij iedere meting de exacte locatie bepaald door middel van post mortem histologie. Dit leidt tot een vermindering in variatie van de data en dus betrouwbaardere statistiek. Dit leidt eveneens tot een lager aantal benodigde dieren.

#### **Verfijning:**

De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. Daarnaast heeft het betrokken team heel veel ervaring met dit type experimenten en hebben wij de experimentele procedure (operatie, habituatie en meting) tot in detail verfijnd.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest, inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel

mogelijk te beperken in combinatie met algehele anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd, omdat de benodigde technische expertise doorgaans niet voorhanden is om de elektrische activiteit te meten van individuele neuronen in ratten die een gedragstaak uitvoeren en deze vervolgens te vullen met een kleurstof. Door onze leidende positie wereldwijd op dit gebied zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en we zijn exact op de hoogte waar hiaten in de kennis voortbestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek succesvol nu uit te kunnen voeren.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De ratten zullen conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

De ratten vertonen vrijwillig, natuurlijk gedrag. Hierdoor is het niet nodig de dieren te motiveren dit gedrag te vertonen door middel van waterrestrictie, zoals in bijlage 3 wordt toegepast.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1 %

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

#### Soort ongerief:

De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten.

A) Licht ongerief (dag 0):

Inductie van inhalatie verdoving voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

B) Matig ongerief (dag 0):

Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

C) Licht ongerief (dag 0-5):

Tijdens de operatie wordt aan de schedel een metalen cilinder vastgeplakt waarmee de ratten vastgezet kunnen worden bij hun kop.

D) Matig ongerief (dag 2 - 5):

Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Zeer bewust wordt ervoor gekozen om de rest van het dier niet vast te zetten tijdens het

experiment (zoals mogelijk met een lichaamsharnas). Bewegingsbeperking van de kop is daarentegen wel matig ongerief en daarom zullen de ratten langzaam worden gewend aan deze vorm van vrijheidsbeperking. Aanvankelijk worden de ratten kort vastgezet (5 min). Tijdens volgende sessies wennen de dieren hieraan en wordt de tijd opgeschroefd (30 min). Na afloop van iedere sessie krijgen de dieren een speciale voedselbeloning.

Tijdens de proef wordt intensief gewerkt met de ratten om volledig vertrouwd te zijn met de experimentele procedure (head-fixatie). De kooien zijn verrijkt met een huisje, speeltjes en nestmateriaal om omstandigheden in de kooi te optimaliseren. Na iedere trainingssessie krijgen de dieren een speciale voedselbeloning. De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken. Wij hebben bijvoorbeeld een kleine kooi ontwikkeld waarin de rat zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment. Ten slotte wordt er perioperatieve pijnbestrijding toegepast.

Cumulatief ongerief: matig.

**Tabel 1:** Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	Ongerief	Aantal dieren (%)	Duur
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cilinder op schedel onder systemische verdoving	licht	100%	2 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	5 – 30 min
6. Kop-fixatie in combinatie met elektrofysiologie	matig	100%	max. 45 min
7. Doden tijdens transcordiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Transcordiale perfusie is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de histologische procedure. In geval van single-unit metingen wordt tijdens de histologie de aangekleurde cel zichtbaar gemaakt voor digitale reconstructie; bij multi-unit metingen wordt de fluorescente markering zichtbaar gemaakt om de meetlocatie vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%;"> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">3</td> <td style="padding: 2px;">Complex gedrag</td> </tr> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Complex gedrag
Volgnummer	Type dierproef					
3	Complex gedrag					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Vraagstelling: wat is de functie van individuele corticale lagen en celtypes in verschillende corticale gebieden ( ) tijdens complex, aangeleerd gedrag?

De eenvoudige gedragstaak (bijlage 2) en complexe gedragstaak (bijlage 3) worden naast elkaar gebruikt om de organisatorische kenmerken van corticale netwerken te bestuderen.

.

Uitkomstparameters: Tijdens de experimenten meten we actiepotentialen van populaties neuronen, terwijl de rat de aangeleerde gedragstaak uitvoert. Door de netwerkactiviteit van individuele of populaties neuronen in te koppelen aan bepaalde aspecten van gedrag (zintuig informatie, nemen van beslissing, krijgen van beloning) willen we achterhalen welke rol(len) de verschillende corticale lagen en celtypes in verschillende subgebieden van de cortex spelen bij de codering van detectie-, keuze- en beloningsprocessen.

- 
- 
- 
-



- [REDACTED]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Alle dieren zullen in paren of groepen worden gehuisvest in het dierenverblijf van het instituut en zullen tot aan de trainingsfase *ad libitum* toegang hebben tot water en voedsel. Tijdens de trainingsfase wordt overgeschakeld op waterbeperking. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. De rat zal water tijdens de trainingssessies kunnen verdienen door middel van het correct uitvoeren van de gedragstaak. De ratten zullen een implantaat op hun schedel bevestigd krijgen, waarmee de kop gefixeerd kan worden in een speciaal daarvoor ontwikkelde stereotact. Vervolgens zullen de ratten over de duur van enkele dagen worden getraind om te kunnen wennen aan de experimentele omstandigheden en om de gedragstaak succesvol uit te voeren.

Tijdens de taak zal *aangeleerd* intelligent gedrag (maken van beslissing) leidend zijn in ons experiment. Deze gedragstaak betreft een go/no-go keuze waarbij de ratten de snorharen gebruiken voor het lokaliseren van een object. Wanneer het object in de "go" positie staat (proximale positie van object), wordt likken beloond met een waterbeloning; staat het object in de "no-go" positie (distale positie van object), dan krijgt de rat geen beloning bij likken, of zelfs een milde straf in de vorm van een tijdspauze. Deze go/no-go taak is jarenlang uitontwikkeld door bevriende labs en wij hebben de afgelopen maanden veel tijd geïnvesteerd om de opstelling zo aan te passen dat het ongerief voor de ratten minimaal is (verfijning) en de experimenten zo stabiel mogelijk zijn (vermindering).

#### **Operatie:**

De operatie wordt op dag 0 onder algehele inhalatie anaesthesie uitgevoerd. Ter aanvulling en uit voorzorg wordt lokale pijnbestrijding toegepast. [REDACTED]

[REDACTED]. In geval van een acuut electrofysiologie experiment wordt een plastic, holle cilinder aangebracht bovenop het corticale gebied van interesse. Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken en vervolgens de opening te beschermen door het afsluiten van de cilinder met de schroefdop. Verder wordt op de schedel een kleine, solide metalen cilinder bevestigd, die het mogelijk maakt de kop te fixeren. De operatie zal ~ 2 uur in beslag nemen.

Ter voorbereiding van chronische electrofysiologie wordt tijdens één en dezelfde operatie zowel een multi-unit probe geïmplanteerd als de head-post geplaatst. De implantatie van de chronische probe geeft de mogelijkheid om tijdens opeenvolgende trainingssessies de activiteit van corticale lagen te bestuderen en is een aanvullende benadering op de acute (single en multi-unit metingen). De voorbereidende operatie voor chronische afleidingen zal ~ 6 uur in beslag nemen.

Na de operatie worden de dieren individueel gehuisvest in verrijkte kooien (huisje, speeltjes en nestmateriaal om de leefomstandigheden te optimaliseren) met voedsel en water *ad libitum*.

#### **Beschrijving go/no-go taak:**

Wij zullen de rat trainen een objectlocatie te herkennen en die te rapporteren door middel van het likken aan een likpoort met watervoorziening. Tijdens deze taak zal het object relatief proximaal (Go, dus likken) of in de relatief distale (No-Go, dus niet likken) locatie gepositioneerd worden.

Wij hebben de apparatuur in intensief contact met deze specialisten custom ontworpen en hebben alles op maat laten maken. Hierbij hebben we verschillende ongerief verminderende eigenschappen aangebracht, zoals een houder waarin het lichaam van de rat gedurende de training en het experiment zit. Hierdoor is geen lichaamsharnas nodig en heeft de rat het gevoel dat hij in een veilige kleine ruimte zit. Verder hebben we een ergonomisch randje aan laten brengen, waarop de rat zijn voorpoten kan zetten, zodat hij zich tijdens fixatie in een natuurlijke rusthouding bevindt. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag.

Om de trainingsfase zo voorspoedig en zo natuurlijk mogelijk te laten verlopen willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

Op de dag van het experiment wordt single of multi-unit electrofysiologie gecombineerd met het uitvoeren van de gedragstaak. De activiteit binnen de verschillende corticale lagen zal worden gecorreleerd aan de prestatie tijdens de taak, met likken tijdens een 'Go' trial en niet likken tijdens een 'No-Go' trial als teken voor aandacht en het maken van de juiste keuze. Corticale activiteit tijdens trials met ongewenst gedrag (likken tijdens 'No-Go' of niet likken tijdens 'Go' trials) zullen vervolgens vergeleken voor trials met correct gedrag.

Na de elektrofysiologische metingen zal het dier onder systemische verdoving gebracht worden voor transcorticale perfusie en ex vivo histologie zal worden uitgevoerd om de precieze locatie van de meetelektrodes ten opzichte van de corticale lagen en anatomische subgebieden vast te stellen, of voor celtype identificatie in geval van single-unit electrofysiologie. Verder zullen we offline spike sorting toepassen om de actiepotentialen van individuele neuronen uit de populatie responses te kunnen isoleren.

### **Samenvatting**

- Stap 1: Operatie. Op de kop van de rat wordt onder algehele anesthesie en onder plaatselijke verdoving een headpost aangebracht en wordt een craniotomie gemaakt, waarop ter bescherming een plastic cilinder wordt bevestigd.
- Stap 2: Herstelperiode waarin de rat in suikerwater gedrenkte voedselpellets krijgt om voedsel- en wateropname te stimuleren. Op de avond van dag 2 wordt de waterfles weg genomen.
- Stap 3: Leren van de mogelijkheid water te verkrijgen uit de likpoort. Elke lik aan de likpoort resulteert in onmiddellijk openen van de waterdruppelaar. Twee trainingen van een uur, of totdat de rat 5 ml/sessie heeft verdiend.
- Stap 4: Detectie van het object leren rapporteren: de rat krijgt alleen water als hij likt nadat het object in de go positie was. Hierbij mag de rat 100 ms na het verschijnen van het object likken en krijgt hij 5 seconden de tijd. Twee trainingen van een uur of 5 ml/sessie. Bij vals alarm klinkt na de eerste 10 goede trials een alarmgeluid en vindt er een 3 seconde time-out plaats. Op de avond van dag 7 krijgt de rat weer een waterfles.
- Stap 5: Training zoals bovenstaand totdat de rat tijdens twee opeenvolgende sessies minstens 85% correct rapporteert, met verschil dat de rat binnen 2 seconden moet rapporteren.
- Experimentele dag: Elektrofysiologische karakterisatie van de functie van individuele corticale lagen en celtypes tijdens het uitvoeren van de gedragstaak.

De Go/No-Go taak is gebaseerd op de sensorische verwerking van een stimulus en de daarop volgende beslissing die wordt gemaakt om al dan niet te likken. Door de gedragstaak te standaardiseren (eenvoudige en complexe taak) en deze gedragstaak te combineren met karakterisatie van activiteit in de corticale lagen [REDACTED], zal het mogelijk zijn in detail te beschrijven hoe de verschillende corticale gebieden bijdragen aan 1) aangeboren en 2) aangeleerd gedrag.

### **Uitval**

[REDACTED] Gezien de reeds aanwezige expertise zijn er geen redenen om aan te nemen dat er uitval zal optreden door post-operationele trauma's, of dat dieren ziek zouden worden door de procedure.

Individuele dieren kunnen uitvallen tijdens de trainingen als het dier duidelijk niet gewend raakt aan fixatie, maar in de praktijk komt dit zelden voor (<1 % van de ratten). Daarnaast wordt er -na overleg met experts- rekening gehouden met 10% uitval van ratten, omdat deze de taak niet leert. Voor het toetsen van gewenning zal het gedrag van het dier tijdens de fixatie worden bekeken. Daarnaast wordt het aantal keutels geteld tijdens de fixatie (hoeveelheid is sterke indicatie voor stress) en zal, voorafgaand aan iedere ochtendtraining, het lichaamsgewicht worden gemeten.

De experimentele procedure van fixeren en gedragstraining is tot in detail verfijnd en het ongerief van de ratten te allen tijde geminimaliseerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Wij willen twee type experimenten doen waarbij we tegelijk óf in dezelfde laag van alle drie de subgebieden, óf in alle drie de lagen van hetzelfde subgebied afleidingen doen. In eerdere publicaties van andere laboratoria die experimenten met een siliconprobe met een enkele 'shank' hebben gedaan, zijn 20-30 ratten per experimentele groep gebruikt. Onze experimenten zijn echter technisch uitdagender doordat wij meerdere shanks plaatsen, waardoor de kans op het niet-optimaal geplaatst zijn van één van de shanks groter is en de data van het experiment niet volledig gebruikt kan worden. Daarentegen denken wij ook dat door de dubbele sampling van elke laag in elk subgebied (eenmaal tegelijk met andere lagen in hetzelfde subgebied en eenmaal met dezelfde laag in andere subgebieden) wij het aantal dieren per groep terug kunnen brengen, zonder te verliezen aan statistische significantie.

De metingen in S1 zijn iets uitdagender dan de metingen in de PFC, omdat de shanks zowel in als tussen de 'barrel-kolommen' van S1 terecht kunnen komen en alleen in de barrel-kolommen kan de relevante informatie gemeten worden. In het geval dat één van de meet-elektrodes niet in de barrel, maar net ernaast terecht komt, kunnen we niet met zekerheid zeggen of de gemeten responsetijd van de neuronen in dat gebied ook daadwerkelijk de responsetijd in S1 weerspiegelt, omdat de gebieden tussen de kolommen de sensorische informatie pas ontvangt na voorbewerking in de barrel-kolom en er dus een kleine vertraging optreedt. Hierdoor denken wij 20 in plaats van 15 ratten per groep te zullen moeten gebruiken.

#### PPC

en de metingen zijn relatief eenvoudig zal het einddoel naar verwachting met 15 dieren behaald kunnen worden.

#### B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal 137, leeftijd 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

Op basis van 2 type metingen, 3 subgebieden en 15 ratten per deelvraag betekent dit dat we  $2 * 3 * 15 = 90$  dieren nodig hebben. Wij verwachten verder, naar aanleiding van gesprekken met collega's die vergelijkbare experimenten in muizen doen en anderen die zowel met muizen als ratten gewerkt hebben, dat  $\pm 10\%$  van de ratten niet goed te trainen is. Dit betekent dat we in totaal 100 dieren nodig hebben. Mocht het in een later stadium nodig zijn dit aantal aan te passen (meer of minder dieren dan de voorgestelde 100), dan rapporteren wij dat terug.

Uitgaande van 1) 15 benodigde ratten voor het behalen van het subdoel, 2) 5 ratten extra vanwege mogelijke plaatsing naast het gewenste gebied en 3) 10% uitval van ratten, die niet goed getraind blijken te kunnen worden, komt het totaal op  $20 * 1,1 = 22$  ratten

15 ratten inclusief de 10% aan dieren die moeite met de taak hebben.

Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem, en de Go/No-Go taak (bijlage 3) uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort (Wister rat) en leeftijd (P25-P40) constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Vervanging

Intelligentie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de sensorische systemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij behorende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier zijn in het verleden altijd in het verdoofde dier uitgevoerd om ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes, of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie of het maken van keuzes niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die een biologisch relevante simulatie van aandacht kunnen genereren. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computerprogrammeurs die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren om een biologisch realistisch netwerk van de cortex "in silico" te reconstrueren. Dit computermodel zou zich op termijn uitermate goed kunnen lenen om basale vraagstukken te beantwoorden.

#### Vermindering

In ■■■ is de relatie tussen gedrag en activiteit veel moeilijker waarneembaar en wordt de correlatie met name op populatieniveau waargenomen. Een benadering met single-unit elektrofysiologie zou een zeer groot aantal dieren vereisen. In ■■■ wordt in dit geval zeer bewust gekozen voor multi-unit afleidingen om grote aantallen cellen per dier te meten (48-96 cellen per dier vs. 2 cellen per dier in afleidingen van individuele cellen). Dit gaat ten koste van het niet volledig kunnen achterhalen van de neuronale morfologie, maar is de meest efficiënte manier om het einddoel te bereiken met gebruik van een beperkt aantal dieren.

Verder zal statistiek worden toegepast om de einddoelen te kunnen bereiken met een minimaal aantal dieren.

### **Verfijning**

De huidige aanvraag richt zich op de vraag hoe intelligent gedrag zich verhoudt tot de netwerkactiviteit [REDACTED]. Om deze vraag te beantwoorden hebben we afleidingen nodig van cellen tijdens cognitief gedrag, wat betekent dat de rat wakker moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken.

De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED]. Daarnaast krijgen de ratten een kooi die verrijkt is met geschikt nesting materiaal en een huisje, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag kunnen uiten. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag. Het dier beëindigt vervolgens de proef als de motivatie omlaag gaat.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken in combinatie met algehele anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier vrijwillig in gaat zitten en zich comfortabel kan voelen tijdens het experiment.

Ten slotte wordt perioperatieve pijnbestrijding toegepast.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Door onze leidende positie wereldwijd op dit gebied zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en zijn we exact op de hoogte waar hiaten in de kennis bestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek nu succesvol uit te kunnen voeren.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De ratten zullen conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In uitzonderlijke gevallen kan er infectie optreden van het operatieve gebied (<5%). Mocht dit voorkomen, zal kortstondig (enkele dagen) antibioticum gegeven worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<5 %

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Cumulatief ongerief: matig.

**Soort ongerief:**

De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten.

A) Licht / geen ongerief (dag -14 – 0)

Habituatie trainingen, interactie met onderzoeker, dagelijks handelen.

B) Licht ongerief (dag 0):

Inductie van inhalatie anesthesie voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

C) Matig ongerief (dag 0):

Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

D) Licht ongerief (dag 3-7 en 10-14)

Om de rat te motiveren deel te nemen aan de gedragstaak wordt de rat op waterbeperking gezet. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. Vooraf aan de training worden de ratten gewogen. Mochten de ratten niet genoeg water weten te verdienen om op gewicht te blijven, dan wordt dit los van de trainingssessies handmatig aangevuld. Het ongerief als gevolg van de tijdelijke wateronthouding is geschat als "licht" na overleg met collega's die zeer veel ervaring hebben met trainingen en wateronthouding in muizen en ratten.

E) Matig ongerief (dag 2 - 14):

Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Om onspecifieke stress tijdens de trainingsfase te vermijden, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

F) Licht ongerief (dag 0-14):

Na implantatie van de head-post moeten wij de rat solitair huisvesten om te voorkomen dat de kooigenoten de wond vervuilen en infecties veroorzaken. De kooi waarin de rat gehuisvest wordt is voorzien van veel voorzieningen om het ongerief tot een minimum te beperken. Zo krijgt de rat een huisje om zich in terug te trekken, bedding materiaal om een nest mee te bouwen en verschillende speeltjes als kooiverrijking.

G) Licht ongerief (dag 2 – dag #):

Uitvoeren van gedragstest.

H) Matig ongerief (dag 14):

Facultatief en alleen relevant voor acute elektrofysiologie: Operatie onder inhalatie anesthesie om craniotomie schoon en open te maken (verwijderen dura mater) en de opening in de schedel voor te bereiden op de acute elektrofysiologie meeting. Dit is een korte operatie (~30 minuten).

I) Licht ongerief (dag 15 – dag #)

Acute elektrofysiologie: Experimentele dag, eenmalige meting. Het plaatsen van de acute single- of multi-unit probe geeft licht ongerief aangezien de rat zich bewust is van de extra handeling. Echter, na het plaatsen van de probe vertoont de rat weer het gewenste gedrag en gaat over tot het uitvoeren van de gedragstaak.

Chronische elektrofysiologie: Experimentele dagen, herhaalde metingen (maximum 40 dagen, 2x per dag). Het uitvoeren van de gedragstaak en het aankoppelen van de chronische meet-elektrodes.

J) Licht ongerief (dag 14):

Het doden van het dier door middel van transcardiale perfusie gebeurt onder volledige anesthesie.



**Tabel 1:** Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	Ongerief	Aantal dieren (%)	Duur
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cylinder op schedel onder volledige verdoving	licht	100%	2 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Tijdelijke waterrestrictie (waterconsumptie wordt dagelijks aangevuld)	licht	100%	max 16 uur gedurende max 40 dagen
6. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	5 – 30 min.
7. Solitaire huisvesting	licht	100%	meerdere dagen
8. Uitvoeren gedragstaak	licht	100%	< 1 uur
9. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	50%	3-5 min
10. Craniotomie openen voor acute meting	licht	50%	1 uur
11. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	50%	1 uur
12a. Kop-fixatie met acute elektrofysiologie	matig	50%	< 1 uur
12b. Kop-fixatie met chronische elektrofysiologie (maximum 40 dagen, 2x per dag)	matig	50%	± 1 uur (metingen worden herhaald)
13. Doden tijdens transcordiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Transcordiale perfusie met paraformaldehyde is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de post mortem histologische procedure. In geval van single-unit metingen wordt tijdens de histologie de aangekleurde cel zichtbaar gemaakt voor digitale reconstructie; bij multi-unit metingen (acuut en chronisch) wordt de fluorescente markering zichtbaar gemaakt om de meetlocatie vast te stellen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Optogenetische interventie tijdens complex gedrag</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	4	Optogenetische interventie tijdens complex gedrag
Volgnummer	Type dierproef					
4	Optogenetische interventie tijdens complex gedrag					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Vraagstelling: wat is het causale verband tussen activiteit in individuele corticale lagen in verschillende corticale gebieden ( ) tijdens complex, aangeleerd gedrag?

De complexe taak (Go/No-Go) wordt gebruikt om corticale codering van gedrag ( ) te kwantificeren (zie bijlage 3). De optogenetische interventie geeft de mogelijkheid om de meest belangrijke (= meest actieve) corticale laag/lagen kortstondig te inactiveren teneinde het effect van optogenetische interventie op gedrag in detail te kunnen bepalen.

Uitkomstparameters: Ratten zullen getraind worden voor het uitvoeren van de complexe gedragstaak (Go/No-Go). Tijdens de operatie zal er in het corticale gebied van interesse zeer lokaal een virusinjectie geplaatst worden. Deze virusinjectie leidt tot de expressie van een lichtgevoelig eiwit in de neuronale populatie dat als aan/uit schakelaar gebruikt kan worden voor neuronale activiteit. Een ledlicht zal bevestigd worden aan de elektrofysiologische meet-elektrode (geen extra ingrepen of verandering van ongerief) en per trial zal dit ledlicht het lichtgevoelige eiwit (en dus de neuronen) aan/uit kunnen zetten. Het doel is om gelijktijdig 1) de activiteit van de corticale lagen in kaart te brengen tijdens het uitvoeren van de gedragstaak door middel van de chronische multi-unit elektrofysiologie en 2) het gevolg van de optogenetische interventie te bepalen op het uitvoeren van de gedragstaak.

De resultaten uit subdoel 3a-c (corticale activiteit tijdens complex gedrag, zie projectvoorstel 3.4.2) zullen ontmaskeren welke lagen in de drie corticale gebieden ( ) een cruciale rol vertolken tijdens het gedrag (toename van neuronale activiteit). Daarnaast zullen wij met subdoel 3a-c ontdekken op welke momenten in de gedragstaak de toename in activiteit maximaal is. De spatiotemporele karakteristieken (corticale laag en momenten tijdens gedrag) van de optogenetische interventie zullen dus worden

afgestemd op de activiteitspatronen, die tijdens subdoel 3a-c worden gemeten. Het effect van de interventie (subdoel 4) wordt vervolgens bepaald aan de hand van het functioneren tijdens de gedragstaak (o.a. hoe goed de taak wordt uitgevoerd voor Go/No-Go trials).

Subdoel 4 is van cruciaal belang om de overkoepelende doelstelling van deze aanvraag te bereiken door te onderzoeken of de correlaties die gevonden worden tussen eenvoudig en complex gedrag en corticale activiteit terug te voeren zijn op een causaal verband tussen neuronale activiteit in een specifieke laag van [REDACTED] en intelligent gedrag.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De behandeling van de dieren is vergelijkbaar met de experimenten die beschreven zijn in bijlage 3 aangezien het gaat om het aanleren van een complexe gedragstaak. Echter, voor subdoel 4 (optogenetische interventie) zal er tijdens de operatie voor de chronische elektrofysiologie een klein volume virus worden geïnjecteerd in het brein van de rat.

Samengevat worden de dieren na operatie individueel gehuisvest in verrijkte kooien met voedsel en water *ad libitum*. Tijdens de trainingsfase wordt overgeschakeld op waterbeperking. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. De rat zal water tijdens de trainingssessies kunnen verdienen door middel van het correct uitvoeren van de gedragstaak. De waterbeperking is tijdelijk en ratten ondervinden hier geen hinder van. Om de rat tijdens de training precies in dezelfde positie te plaatsen en om stabiele elektrofysiologische afleidingen te kunnen doen, zullen de ratten een implantaat op hun schedel bevestigd krijgen, waarmee de kop gefixeerd kan worden in een speciaal daarvoor ontwikkelde stereotact. Tijdens de operatie wordt een multi-unit elektrode geïmplanteerd waarop een kleine optische fiber is bevestigd (diameter ~100 micrometer). Na de operatie zullen de ratten worden getraind om te wennen aan de experimentele omstandigheden en om de gedragstaak succesvol uit te voeren. De ratten gaan na verloop van tijd vrijwillig de houder in voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond te worden voor gewenst gedrag.

Tijdens de taak zal aangeleerd intelligent gedrag leidend zijn (maken van de juiste keuze). De gedragstaak betreft de Go/No-Go keuze waarbij de ratten de snorharen gebruiken voor het lokaliseren van een object (zie bijlage 3). Wanneer het object in de "Go" positie staat (proximale positie van object), wordt likken beloond met een waterbeloning; staat het object in de "No-Go" positie (distale positie van object), dan krijgt de rat geen beloning bij likken of zelfs een milde straf in de vorm van een tijdspauze.

#### **Operatie:**

De operatie wordt onder inhalatie narcose uitgevoerd. Ter aanvulling en, uit voorzorg, wordt lokale en peri-operatieve pijnbestrijding toegepast. Met behulp van anatomische coördinaten wordt [REDACTED] gelocaliseerd. Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken voor chronische implantatie van een multi-unit elektrode en een kleine, solide metalen cilinder te bevestigen, die het mogelijk maakt de kop te fixeren.

#### **Virusinjectie:**

Voorafgaand aan de implantatie van een chronische multi-unit elektrode zal een kleine pipet gevuld met virus met behulp van de stereotact in de hersenen worden ingebracht en zal een kleine hoeveelheid virus worden geïnjecteerd (enkele nanoliters). De pipet zal worden teruggetrokken, waarna er verder gegaan zal worden met het plaatsen van de multi-unit probe inclusief ledlicht voor de activatie van lichtgevoelige eiwitten. De lichtbundel bestaat uit een uiteinde dat in hersenen geplaatst wordt en een uiteinde met een bevestigingspunt voor de externe kabel.

#### **Go/No-Go taak (zie ook bijlage3):**

Wij zullen de rat trainen een objectlocatie te herkennen en die te rapporteren door middel van het likken aan een likpoort met watervoorziening.

Om de trainingsfase zo voorspoedig en zo stressloos mogelijk te laten verlopen, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en de rat leert dat de

trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

Tijdens de eindfase van het experiment (de rat voert de taak goed uit) wordt het uitvoeren van de gedragstaak gecombineerd met multi-unit elektrofyysiologie en optogenetische interventie. Optogenetische interventie zal worden gebruikt om de corticale laag/lagen tijdens een specifiek moment van de gedragstaak te remmen. De werkhypothese is dat dit een direct effect heeft op het gedrag, omdat de corticale laag zijn/haar functie niet kan vertolken. De uitleesparameters zijn het likken tijdens een 'Go' trial en niet likken tijdens een 'No-Go' trial als teken voor aandacht en het maken van de juiste keuze. Corticale activiteit tijdens de trials waarin de rat ongewenst gedrag vertoont (likken tijdens 'No-Go' of niet likken tijdens 'Go' trials) zullen vergeleken worden met corticale activiteit tijdens trials met gewenst gedrag. Met de optogenetische interventie in beide type trials zal zodoende een causaal verband beschreven kunnen worden tussen activatie van corticale gebieden en lagen in relatie tussen verschillende tijdstippen in de cognitieve taak.

Aan het eind van de procedure zal het dier onder systemische verdoving worden gebracht voor transcaderale perfusie en ex vivo histologie zal worden uitgevoerd om de precieze locatie van de meetelektrode ten opzichte van de corticale lagen en anatomische subgebieden vast te stellen. Verder zullen we offline spike sorting toepassen om de actiepotentialen van individuele neuronen uit de populatie responses te kunnen isoleren.

### **Samenvatting**

- Stap 1: Operatie. Op de kop van de rat wordt onder algehele anesthesie en onder plaatselijke verdoving een headpost aangebracht en wordt een craniotomie gemaakt, waarop ter bescherming een plastic cilinder wordt bevestigd.
- Stap 2: Herstelperiode waarin de rat in suikerwater gedrenkte voedselpellets krijgt om voedsel- en wateropname te stimuleren. Op de avond van dag 2 wordt de waterfles weggenomen.
- Stap 3: Leren van de mogelijkheid water te verkrijgen uit de likpoort. Elke lik aan de likpoort resulteert in onmiddellijk openen van de waterdruppelaar. Twee trainingen van een uur, of totdat de rat 5 ml/sessie heeft verdiend.
- Stap 4: Detectie van het object leren rapporteren. De rat krijgt alleen water als hij likt nadat het object in de go positie was. Hierbij mag de rat 100 ms na het verschijnen van het object likken en krijgt 5 seconden de tijd. Twee trainingen van een uur of 5 ml/sessie. Bij vals alarm klinkt na de eerste 10 goede trials een alarmgeluid en vindt er een 3 s time-out plaats. Op de avond van dag 7 krijgt de rat weer een waterfles.
- Stap 5: Training zoals bovenstaand totdat de rat tijdens twee opeenvolgende sessies minstens 85% correct rapporteert, met dit verschil dat de rat binnen 2 seconden moet rapporteren.
- Experimentele dagen: Elektrofyysiologische karakterisatie van de activiteit van individuele corticale lagen en celtypes tijdens het uitvoeren van de gedragstaak. De optogenetische interventie bestaat uit het random selecteren van trials (Go en No-Go trials) waar het ledlicht wordt aangezet tijdens een specifieke fase van de trial (start-, detectie-, keuze- of beloningsfase).

De optogenetische interventie in combinatie met elektrofyysiologische meting en bepaling van gedragsprestatie zal een zeer gedetailleerd beeld geven over het causale verband tussen de activiteit in een corticale laag in een specifiek gebied ( ) en cognitieve prestaties. De kwantitatieve aspecten van optogenetische interventie (timing en duur van interventie) zullen worden bepaald aan de hand van de resultaten uit subdoel 3 (complex gedrag, figuur 4 hoofdaanvraag).

Na afloop van de proef moeten we controleren hoe de elektrodes, lichtbundel of virale injecties geplaatst zijn. Hiervoor wordt het dier transcaderaal geperfuseerd onder algehele anesthesie. Na fixatie worden de hersenen uitgedieprepareerd en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor analyse.

## **Uitval**

Gezien de reeds aanwezige expertise zijn er geen redenen om aan te nemen dat er uitval zal optreden door post-operationele trauma's, of dat dieren ziek zouden worden door de procedure.

Individuele dieren kunnen uitvallen tijdens de trainingen als het dier duidelijk niet gewend raakt aan fixatie, maar in de praktijk komt dit zelden voor (<1 % van de ratten). Daarnaast wordt er -na overleg met experts- rekening gehouden met 10% uitval van ratten, omdat deze de taak niet leert. Voor het toetsen van gewenning zal het gedrag van het dier tijdens de fixatie worden bekeken. Daarnaast wordt het aantal keutels geteld tijdens de fixatie (hoeveelheid is sterke indicatie voor stress) en zal, voorafgaand aan iedere ochtendtraining, het lichaamsgewicht worden gemeten.

De experimentele procedure van fixeren en gedragstraining is tot in detail verfijnd en het ongerief van de ratten te allen tijde geminimaliseerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

### Optogenetica:

Wistar ratten, eigen fok of aangekocht van erkende leverancier. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt om de resultaten consequent en vergelijkbaar te houden voor het overkoepelende einddoel. Op basis van soortgelijke experimenten en ervaring met relevante statistiek wordt ingeschat dat er 10 dieren per optogenetische interventiegroep nodig zijn om verschillen in gedrag te kunnen opmerken. Voor de drie hersengebieden ( ) willen we optogenetische interventie toepassen voor de diepe output laag 5 en voor de oppervlakte laag 2/3.

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximum aantal 81, 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

Op basis van 3 hersengebieden ( ), twee celtypes per gebied (L2/3 en L5) en 10 ratten per groep betekent dit  $3 \text{ (hersengebieden)} \times 2 \text{ (lagen)} \times 10 \text{ (dieren)} = 60$  dieren. Het controle experiment bestaat uit de injectie van een inactief virus en zal in 1 hersengebied toegepast worden (eveneens 10 dieren).

In een deel van de experimenten verwachten we dat de virusinjectie stereotactisch niet optimaal geplaatst is, of houden we rekening met andere factoren die tot uitval kunnen leiden. Uit ervaring kan dit bij ongeveer 15% van de ratten optreden. Dit betekent dat we 15% extra dieren nodig hebben, dus  $70 \times 1.15 = 80.5$  dieren (70 goed geplaatst, 11 incorrect geplaatst). Totaal aantal dieren: 81 dieren

Er zullen in de experimenten die beschreven zijn in bijlages 1-4 alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem en de Go/No-Go (bijlage 3 en 4) taak uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort en leeftijd (P25-P40) constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden, kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

##### **Vervanging:**

Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de sensorische systemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij behorende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier zijn in het verleden altijd in het verdoofde dier uitgevoerd om zoveel mogelijk ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes, of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie of het maken van keuzes niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die een biologisch relevante simulatie van aandacht kunnen genereren. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computerprogrammeurs die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren om een biologisch realistisch netwerk van de cortex "in silico" te reconstrueren. Dit computermodel zou zich op termijn uitermate goed kunnen lenen om basale vraagstukken te beantwoorden.

##### **Vermindering:**

Onze proefopzet is erop gericht een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van onze onderzoeksvraag. Indien het slagingspercentage van de experimenten hoger blijkt te liggen, zullen niet alle dieren worden gebruikt. Het controle experiment (inactief virus) zal geïnjecteerd worden in 1 hersengebied en als controle kunnen dienen voor alle drie de hersengebieden. Op deze manier hoeft het controle experiment slechts eenmaal uitgevoerd te worden en wordt het totaal aantal dieren verminderd. Ten slotte zullen de resultaten van de experimenten uit bijlage 3 leidend zijn voor de proefopzet van bijlage 4 om met zo min mogelijk dieren een maximaal effect van optogenetische interventie te bewerkstelligen. Dit zal eveneens het aantal benodigde dieren voor het behalen van het einddoel minimaliseren.

##### **Verfijning:**

De huidige aanvraag richt zich op het causale verband tussen corticale activiteit en intelligente prestaties. Om deze vraag te beantwoorden, hebben we afleidingen nodig van neuronen tijdens cognitief gedrag in combinatie met optogenetische interventie. Dit betekent dat de rat wakker moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken. De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is en de experimenten beschreven in bijlage 4 worden afgestemd op de resultaten uit bijlages 2 en 3. [REDACTED]

[REDACTED]. Daarnaast krijgen de dieren een huisje in de kooi, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag vertonen, inclusief geschikt nesting

materiaal, speeltjes etc. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag. Het dier beëindigt vervolgens de proef als de motivatie omlaag gaat.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken in combinatie met inhalatie anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment. Het ontwerp van de verschillende componenten is gemaakt na overleg met experts in het veld en naar aanleiding van gepubliceerde bevindingen over de standaardisatie, optimalisatie van ergonomie en reproduceerbaarheid van meetomstandigheden.

Adequate anesthesie en perioperatieve pijnbestrijding wordt toegepast.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

De optogenetische interventie tijdens de Go/No-Go taak is niet eerder op deze manier uitgevoerd in ratten. Wij zijn zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en we zijn exact op de hoogte waar hiaten in de kennis voortbestaan, met name in het causale verband tussen laag-specifieke activiteit in verschillende corticale gebieden onder dezelfde gestandaardiseerde gedragsomstandigheden. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd, en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek succesvol nu uit te kunnen voeren.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De ratten zullen voorafgaand aan de operatieve ingreep conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.



Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In uitzonderlijke gevallen kan er infectie optreden van het operatieve gebied (<5%). Mocht dit voorkomen, zal kortstondig (enkele dagen) antibioticum gegeven worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<5 %

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Cumulatief ongerief: matig.

#### Soort ongerief:

De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens



zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten. Waar mogelijk wordt ongerief consequent geminimaliseerd en is "licht" of "matig".

A) Licht ongerief (dag -14 – 0)

Habituatie trainingen, interactie met onderzoeker, dagelijks handelen.

B) Licht ongerief (dag 0):

Inductie van inhalatie verdoving voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

C) Matig ongerief (dag 0):

Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

D) Licht ongerief (tijdens gedragstraining)

Om de rat te motiveren deel te nemen aan de gedragstaak, wordt de rat op waterbeperking gezet. Vooraf aan de training worden de ratten gewogen. Mochten de ratten niet genoeg water weten te verdienen om op gewicht te blijven, dan wordt dit los van de trainingssessies handmatig aangevuld. Na overleg met collega's, die zeer veel ervaring hebben met trainingen en wateronthouding bij muizen en ratten wordt het ongerief als gevolg van de tijdelijke wateronthouding als "licht" geschat.

E) Matig ongerief (dag 2-14):

Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Om onspecifieke stress tijdens de trainingsfase te vermijden, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

F) Licht ongerief (dag 0-14):

Na implantatie van de head-post wordt de rat solitair gehuisvest om te voorkomen dat de kooigenoten de wond vervuilen en infecties veroorzaken. De kooi waarin de rat gehuisvest wordt, is verrijkt met veel voorzieningen om het ongerief tot een minimum te beperken. Zo krijgt de rat een huisje om zich in terug te trekken, bedding materiaal om een nest mee te bouwen en verschillende speeltjes als kooiverrijking.

G) Licht ongerief (dag 2 – dag #):

Uitvoeren van gedragstest.

H) Licht ongerief (dag 15 - dag #)

Experimentele dagen, herhaalde metingen (maximum 40 dagen, 2x per dag). Het uitvoeren van de gedragstaak, het aankoppelen van de chronische meet-elektrodes en de optogenetische interventie.

I) Terminaal ongerief (eind van de proef):

Het doden van het dier d.m.v. transcorticale perfusie gebeurt onder algehele anesthesie.

**Tabel 1:** Overzicht van het ongerief bij verschillende ingrepen.

Procedures	Ongerief	Aantal dieren (%)	Duur
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cylinder op schedel, chronische probe, virus injectie onder volledige verdoving.	licht	100%	4 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Tijdelijke waterrestrictie (waterconsumptie wordt dagelijks aangevuld)	licht	100%	max 16 uur gedurende max 40 dagen
6. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	meerdere dagen
7. Solitaire huisvesting	licht	100%	meerdere dagen
8. Uitvoeren gedragstaak	licht	100%	< 1 uur
9. Kop-fixatie met chronische elektrofysiologie en optogenetische interventie (maximum 40 dagen, 2 metingen per dag)	matig	100%	± 1 uur (metingen worden herhaald)
10. Doden tijdens transcordiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Transcordiale perfusie is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de post mortem histologische procedure. Tijdens de histologie worden 1) de exacte stereotactische coördinaten van de virusinjectie vastgesteld en 2) de locatie van de multi-unit meetelektrode ten opzichte van de anatomische kenmerken vastgesteld (corticale gebieden en lagen).

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
*Het NVWA nummer is 11200*
2. Titel van het project:  
*De structuur en functie van corticale netwerken*
3. Titel van de NTS:  
*Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: *020-59889038*
  - e-mailadres contactpersoon: *ivd.amd@vu.nl*
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: : *06-06-2017*
  - aanvraag compleet: : *06-06-2017*
  - in vergadering besproken: *13-06-2017*
  - anderszins behandeld: *n.v.t*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *15-06-2017 tot 29-06-2017*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *11-08-2017*
  - advies aan CCD: *16-08-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
  - Datum advies IvD: *06-06-2017*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *15-06-2017*
- Strekking gestelde vragen: *In de NTS staat nogal veel tekst, focus meer op het wetenschappelijk belang en minder op het maatschappelijk belang; het gaat hier om fundamenteel onderzoek. De DEC vraagt zich af waarom de morfologische typering van celtypes nog nodig is, hier is toch al veel kennis over beschikbaar? Het onderzoek is opgebouwd uit 4 onderdelen, hoe hangen deze onderdelen samen? De nummering in het voorstel is verwarrend. In de bijlagen is het aantal celtypen, het aantal dieren en de mate van ongerief nog niet helder genoeg.*

- Datum antwoord: 29-06-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De aanvraag is aangepast op de bovenstaande punten. Het wetenschappelijk belang is meer benadrukt. de DEC heeft gelijk dat er verschillende zeer belangrijke publicaties zijn geweest over verschillende celtypes, [REDACTED]. In dit onderzoek ligt de nadruk op de vorm en projectie-gebieden van de complete axonale structuren en juist deze informatie ontbreekt op de open source databases. Het projectvoorstel gaat dus om nieuwe experimenten met nieuwe uitkomsten. er is een sectie toegevoegd aan 3.4.1 om de koppeling tussen elektrofysiologie en morfologie helder te verduidelijken. De nummering is aangepast. De tekst is aangepast om dit te verduidelijken.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

#### Vraagronde 1

- Datum: 17-07-2017
- Strekking gestelde vragen: *Er zijn nog enkele tekstuele opmerkingen bij de NTS. In de bijlagen zijn de humane eindpunten en de mate van ongerief nog niet duidelijk genoeg weergegeven.*
- Datum antwoord: 11-08-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De NTS en de bijlagen zijn aangepast.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): *n.v.t.*

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. *Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: n.v.t.*



*voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten zullen meer inzicht geven in de structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) en deze kennis kan in de toekomst bijdragen aan het beschikbaar komen van betere therapieën voor de behandeling van hersenziekten. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opzet en de financiële ondersteuning.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdooving en pijnbestrijding.*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

*De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.*

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.*

*De dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. Van alle dieren zal 20% terminaal ongerief en 80% matig ongerief ervaren.*

*Alle ratten zullen een operatie onder anesthesie ondergaan. Een deel van de ratten zal onder anesthesie blijven tijdens de procedure en niet ontwaken (20% terminaal ongerief). De ratten die ontwaken om aan gedragstaken deel te kunnen nemen (80%), ondervinden matig ongerief als gevolg van de operatie, met name tijdens het ontwaken en herstel. Daarnaast zal ongerief ontstaan als gevolg van het fixeren van het hoofd (kort matig, na training licht) en tijdens de gedragstest (licht). De ratten raken hier echter snel aan gewend doordat alle procedures zijn*

*gestandaardiseerd, de testtijden voorspelbaar zijn en omdat de dieren worden beloond na afloop van fixatie. Door de beloning ontstaat een positieve associatie met de onderzoeker en alle ratten vertonen na verloop van tijd gedrag dat niet meer te onderscheiden is van ratten die vrij rond bewegen.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren gedragstesten in combinatie met hoofdfixatie ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd.*

*Tijdens de terminale proeven is er geen sprake van humane eindpunten (dierproef 1).*

*Bij dierproef 2, 3 en 4 zullen de dieren een hoofdimplantaat operatie krijgen hierbij gelden de volgende humane eindpunten: Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen van het implantaat. De kans hierop is <1% in dierproef 2 en <5 % bij dierproef 3 en 4. Voordat meer dan matig ongerief optreedt worden de humane eindpunten toegepast.*

### **3V's**

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdier vrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin de zintuigsystemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij horende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het zintuigorgaan als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie niet te bestuderen. Ook bestaan er tot nu toe nog geen computermodellen die aandacht kunnen simuleren of op een biologisch relevante manier informatieverwerking in corticale netwerken kunnen nabootsen (dit is wel in ontwikkeling en kan mogelijk op termijn het gebruik van dieren verminderen, of in enkele gevallen zelfs vervangen).*

*De keuze voor het gebruik van rat is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De cortex van de rat vertoont veel overeenkomsten met de cortex van de mens. En omdat men met dit onderzoek de fundamentele aspecten van intelligent gedrag en de onderliggende hersennetwerken wil onderzoeken, is gekozen voor één van de meest gebruikte diermodellen, namelijk de rat.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk



dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Er zullen meerdere metingen per dier en herhaalde metingen in de tijd worden uitgevoerd om zo een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 623 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

*Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.*

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. Het onderzoek wordt uitgevoerd door zeer ervaren onderzoekers die gebruik maken van gestandaardiseerde en geoptimaliseerde procedures om variatie tussen individuele experimenten te voorkomen.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: *n.v.t.*

### ***Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef***

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*Bij dit onderzoek zullen alleen mannetjes ratten worden gebruikt. Dit omdat er diverse verschillen bekend zijn tussen mannen en vrouwen bij dit type onderzoek. Er is aangetoond dat de anatomische kenmerken van het somatosensorische (snorhaar) systeem in de cortex significant verschilt tussen mannetjes en vrouwtjes. Daarnaast is aangetoond dat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. De gedragstaak in dit onderzoek gaat uit van informatieverwerking in dit systeem en de Go/No-Go taak moet worden uitgevoerd met behulp van somatosensorische informatie. Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt in de experimenten van bijlage 1-4 om uit te sluiten dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus. Het gebruik van dezelfde diersoort, sekse en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk

is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*Na het doden van de dieren zal men de hersenen gebruiken voor verdere post mortem histologische analyses. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

### **NTS**

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) tijdens gestandaardiseerd gedrag het gebruik van maximaal 623 ratten die daarvan terminaal tot matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden terminaal tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de corticale netwerken. De waarden die voor patiënten met hersenziekten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel in de toekomst wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen betere therapieën voor de behandeling van hersenziekten.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 623 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Om meer kennis te krijgen over de fundamentele aspecten van intelligent gedrag en de functie van onderliggende hersennetwerken is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment nog geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het verkrijgen van meer kennis over structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) tijdens gestandaardiseerd gedrag. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 623 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het wetenschappelijk belang is substantieel, daarnaast is er een indirect maatschappelijk belang. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de corticale hersennetwerken tijdens gestandaardiseerd gedrag en kunnen in de toekomst bijdragen aan het beschikbaar komen van een betere behandeling van hersenziekten.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk belang en het indirecte maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 623 ratten en het daarbij verwachte terminale tot maximaal matige ongerief.*

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

van der Boechhorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM



**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  
AVD1120020173084

**Bijlagen**

2

Datum 21 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2017. Het gaat om uw project "De structuur en functie van corticale netwerken". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1120020173084. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

21 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1120020173084

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
21 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11200  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Amsterdam  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 53815211  
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1105  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
21 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]  
Adres: van der Boechhorststraat 1  
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

**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: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 31 december 2022  
Titel project: De structuur en functie van corticale netwerken  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.684,-  
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: [REDACTED]  
Functie: 13 f functionaris (Proefdierdeskundige)  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 21 augustus 2017

**Datum:**  
21 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

van der Boechhorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM



**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  
AVD1120020173084

**Bijlagen**

2

Datum 21 augustus 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 21 augustus 2017  
Vervaldatum: 20 september 2017  
Factuurnummer: 173084

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1120020173084	€ 1.684,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 21 september 2017 15:35  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: AVD1120020173084: aanhouden beoordelen

**Urgentie:** Hoog

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

De antwoorden van de onderzoekers op de onderstaande vragen van de CCD zijn vandaag geupload via de NetFTP verbinding.

Daarnaast hebben de onderzoekers de NTS aangepast, deze is ook naar u verstuurd.

Het gaat hierbij om 2 documenten van: AVD\_11200 met de naam: '3084\_CorticaleNetwerken\_Reactie\_op\_vragen CCD.pdf' en '3084\_CorticaleNetwerken\_Niet-technischeSamenvatting\_ingekort.pdf'

Graag vernemen we of u deze documenten in goede orde heeft ontvangen.

Mocht er nog meer informatie nodig zijn dan horen we dat graag.

Met vriendelijke groet,

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 13 september 2017 10:52  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** AVD1120020173084: aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED],

Op 21 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1120020173084. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- In bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 wordt waterdeprivatie toegepast. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor waterdeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie). Daarnaast wordt u verzocht de keuze voor de hoeveelheid vloeistof (in relatie tot gewicht en leeftijd van de dieren) en de effecten daarvan op de dieren beter te onderbouwen. Bovendien wordt u verzocht te beschrijven of de dieren volledig hersteld zijn van de operatie voordat de waterfles weggenomen wordt. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

- De NTS is veel langer dan 500 woorden. U wordt verzocht deze in te korten.

**Opsturen binnen veertien dagen**

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

██████████

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....  
**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----  
Van: Info-zbo  
Verzonden: maandag 21 augustus 2017 15:55  
Aan: ██████████  
CC: ██████████  
Onderwerp: Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven 1120020173084

Geachte ██████████

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

██████████

Namens:  
  
Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Amsterdam, 21 September 2017

Betreft: vragen van CCD naar aanleiding van AVD1120020173084

- *In bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 wordt waterdeprivatie toegepast. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor waterdeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie).*

**Reactie opmerking 1:** Knaagdieren hebben zich tijdens de evolutie aangepast om goed te kunnen overleven in condities waarin weinig water voorhanden is. Daarnaast is het aangetoond, dat waterrestrictie minder ingrijpend is in verhouding tot calorische restrictie (zie oa. Armstrong et al., 1980 en Rowland, 2007). Om deze redenen is het gebruik van waterrestrictie een nuttig middel om ratten te motiveren deel te nemen aan een gedragstaak (zie oa. Schwarz et al., 2010).

Belangrijk: In onze proefopzet betekent waterrestrictie dat de dieren niet ad libitum water krijgen, maar dat de dieren de dagelijkse behoefte verdienen tijdens het deelnemen aan de gedragstaak op vaste momenten van de dag.

Uitdroging van de rat wordt voorkomen doordat nauwkeurig wordt gemeten hoeveel water wordt verdiend tijdens de gedragstaak. Wanneer het volume water dat wordt verdiend niet voldoende is om op gewicht te blijven, wordt extra water zonder voorwaardes aangeboden ter consumptie. [REDACTED]

Tijdens de trainingen is de gedragstaak aanvankelijk zeer eenvoudig en is het geen probleem voor de ratten om voldoende water te verdienen. Het hoge aantal herhalingen (~200 trials) van de gedragstaak en herhaalde mogelijkheden (meerdere sessies per dag) om water te verdienen is een 2<sup>de</sup> garantie waardoor het voor de ratten geen enkel probleem is om de dagelijkse hoeveelheid water te verdienen. Ten slotte kunnen wij de hoeveelheid water per beloningsmoment nauwkeurig vaststellen om te garanderen dat het totale volume van de beloning toereikend is voor de behoefte van de dieren.

Wij hebben ook de mogelijkheid van positieve stimulatie overwogen, al is het niet volledig duidelijk wat de CCD commissie hier bedoelt. Het is geen optie om farmacologische (positieve) beloning te geven omdat dit fundamentele processen in de hersenen beïnvloedt. Het gebruik van suikerwater of andere zoete vloeistoffen is zeer nadelig voor het gebruik van én hygiëne in het lab en kan leiden tot infectiegevaar en vervuiling van de opstelling. Concluderend is beloning met water de meest optimale beloning voor ratten, die door beperkt wateraanbod intrinsiek gemotiveerd zijn om deel te nemen aan de gedragstaak.

- Daarnaast wordt u verzocht de keuze voor de hoeveelheid vloeistof (in relatie tot gewicht en leeftijd van de dieren) en de effecten daarvan op de dieren beter te onderbouwen.

**Reactie opmerking 2:** Wistar ratten kunnen algehele waterrestrictie gedurende 48 uur zonder blijvende fysiologische veranderingen doorstaan (Armstrong et al., 1980). Onder *ad libitum* condities drinken ratten dagelijks ongeveer 10% van hun lichaamsgewicht (Kissileff et al., 1969). Voor onze ratten (8-24 weken, 280 tot 400 g) zou dit betekenen dat ze 25-35 ml per dag drinken, maar in de praktijk is 12 ml/dag voldoende voor een stabiel lichaamsgewicht en wordt dit volume verdient in 2 of 3 trainingssessies per dag. Uit welzijnsoogpunt willen wij voorkomen dat onze ratten minder dan dit volume ontvangen. Daarom wordt het verdiende volume water nauwgezet bijgehouden en wordt ingegrepen indien een rat op een dag minder dan de 12 ml dreigt te verdienen. Allereerst wordt dit gedaan door een extra trainingssessie toe te voegen aan het programma. Mocht dat niet voldoende zijn, dan wordt de rat het overige water aangeboden in de vorm van in water gedrenkte voedselpellets. Ratten vinden natte pellets zeer aantrekkelijk en eten deze gelijk op. Op deze manier wordt zowel de voedsel- als waterinname gegarandeerd. Mocht dit niet voldoende zijn, wordt de rat eenmalig een dag in een kooi met *ad libitum* water geplaatst. Indien het dier ook hierna te weinig vocht binnen krijgt om op gewicht te blijven, wordt deze uit het experiment genomen.

- Bovendien wordt u verzocht te beschrijven of de dieren volledig hersteld zijn van de operatie voordat de waterfles weggenomen wordt.

**Reactie opmerking 3:** de waterrestrictie wordt 10 dagen na de operatie ingezet nadat vastgesteld is dat de wond vrijwel volledig hersteld is (dicht en droog). De tweede belangrijke voorwaarde voor het starten van waterrestrictie is dat het lichaamsgewicht constant toename laat zien in de periode na de operatie zoals verwacht mag worden van een gezond dier en een normale groeicurve.

- Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

**Reactie opmerking 4:** Zie reactie opmerking 2 voor uitgebreide reactie. Samengevat: het verdiende volume water wordt nauwkeurig bijgehouden. Indien een rat op een dag niet voldoende verdient wordt als volgt gehandeld:

- 1) extra trainingssessie
- 2) in water gedrenkte voedselpellets
- 3) eenmalig *ad libitum* water

-De NTS is veel langer dan 500 woorden. U wordt verzocht deze in te korten.

**Reactie:** de NTS is ingekort.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

van der Boechhorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM  


**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  
AVD1120020173084  
**Bijlagen**  
1

Datum 25 september 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 21 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De structuur en functie van corticale netwerken" met aanvraagnummer AVD1120020173084. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 september 2017 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Wij hebben u vragen gesteld over uw onderbouwing van het gebruik van waterdeprivatie en de wijze waarop het welzijn van de dieren tijdens deprivatie geborgd wordt. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "De structuur en functie van corticale netwerken" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om

aanvullende informatie gevraagd. Op 21 september 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC gaat in haar reactie in op het gebruik van waterdeprivatie en uw onderbouwing voor het individueel huisvesten van dieren.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

**Datum:**  
25 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

#### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Vrije Universiteit Amsterdam  
**Adres:** de Boelelaan 1105  
**Postcode en plaats:** 1081 HV AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "De structuur en functie van corticale netwerken" met aanvraagnummer AVD1120020173084, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 september 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 21 augustus 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 september 2017

Centrale Commissie Dierproeven



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**  
25 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Morfologie</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	120	100% Terminal	
<b>3.4.4.2. Eenvoudig gedrag</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	285	100% Matig	
<b>3.4.4.3. Complex gedrag</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	137	100% Matig	
<b>3.4.4.4. Optogenetische interventie tijdens complex gedrag</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	81	100% Matig	

#### **Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD.

**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020173084

De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD1120020173084

## 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

**Aanvraagnummer:**

AVD1120020173084

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 blijven 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.