

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20173124	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

3124



29 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 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.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	53815211
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>	Straat en huisnummer	de Boeelaan 1105
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(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?	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
	<input type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 <div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%;"></div>

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1-1-2018
	Einddatum	31-12-2022
3.2 Wat is de titel van het project?	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
	Postadres	Amsterdam Nederland
	E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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 *
		* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.
		Inkoopordernummer: Factuuradres:
		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: <ul style="list-style-type: none"> 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
		Functie
		Plaats
		Datum
		Handtekening



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1 Vul uw
- .1 deelnemernummer van de
- 1 Vul de naam van de
- .2 instelling of organisatie in.
- 1 Vul de titel van het
- .3 project in.

2 Categorie van het project

- 2 In welke categorie valt Fundamenteel onderzoek
- .1 het project. Translationeel of toegepast onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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.

De prefrontale cortex (PFC) in onze hersenen zorgt ervoor dat we onze aandacht kunnen vasthouden en relevante informatie uit onze omgeving kunnen filteren in een doelgerichte manier. Ook reguleert de PFC gedrag en emoties, voornamelijk door het inhiberen van ongepaste emoties, impulsen en gewoontes. Inhibitie van gedrag is beïnvloed in neuropsychiatrische aandoeningen zoals schizofrenie, attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), verslaving, depressie en autisme. De prevalentie is van deze ziektebeelden is aanzienlijk. Alleen al in Nederland hebben geschat 37.000 mensen schizofrenie, 110.000 mensen ADHD en zijn er nog veel meer mensen met andere PFC-gerelateerde stoornissen (Ministerie van Volksgezondheid, 2011). In patiënten met deze psychiatrische aandoeningen zien we doorgaans ook afwijkingen in PFC activiteit en bijbehorende cognitieve symptomen.

De PFC bestaat uit een uitgebreid netwerk van verschillende soorten neuronen. De outputneuronen van de PFC, de pyramidaalcellen, zijn sterk verbonden met verschillende hersengebieden, bijvoorbeeld het striatum en de thalamus. Ook krijgt de PFC veel input vanuit het brein. Dit kan reciprocale glutamaterge input zijn vanuit bijvoorbeeld de thalamus, of in de vorm van neuromodulators vanuit bijvoorbeeld de basale voorhersenen. Door deze uitgebreide top-down connectiviteit bevindt de PFC zich in de uitstekende positie om gedrag te beïnvloeden. Verschillende onderzoeken hebben met behulp van lesies of farmacologie de rol van de PFC vastgesteld in verschillende cognitieve taken (Passetti et al., 2002). Hoewel waardevol kunnen we met deze methodes geen onderscheid maken tussen specifieke populaties pyramidaalcellen, ingedeeld op basis van hun projectiegebied. De rol van de verschillende soorten neuronen in het focussen van aandacht en het controleren van gedrag is onbekend, maar het begrijpen van deze rol is essentieel om de werking van de gezonde of zieke hersenen te begrijpen.

Zowel de activiteit van de pyramidaalcellen als de mate van aandacht houdt verband met zowel snelle fluctuaties als langzamere veranderingen van de hoeveelheid neurotransmitter acetylcholine in de PFC. Het verlies van acetylcholine functie is geassocieerd met verschillende cognitieve problemen zoals geheugenverlies en aandachtsstoornissen, welke te zien zijn in dementie, de ziekte van Alzheimer's en schizofrenie (Freedman 2014, Sarter et al.). Ondanks de uitgebreide anatomische data over de organisatie van het cholinerge systeem is er weinig bekend over de functionele organisatie. Hoe zowel cholinerge interneuronen in de PFC als cholinerge input neuronen naar de PFC cognitieve processen beïnvloeden is nog onbekend.

Een van de belangrijkste doelen binnen de neurowetenschappen is het begrijpen hoe het gedrag van individuele neuronen leidt tot hogere cognitieve processen zoals aandacht. Recente doorbraken in moleculaire technieken geven onderzoekers nu de mogelijkheid naar specifieke neuronale populaties te kijken door gebruik van virale technieken. Met *Calcium imaging* en elektrofysiologie is het nu mogelijk om nauwkeurig de activiteit van neuronale populaties te volgen tijdens gedrag. Door middel van *optogenetica* en *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs)* kunnen we vervolgens die neuronale populaties manipuleren tijdens een complexe gedragstaak.

We willen met dit onderzoeksvoorstel begrijpen hoe de PFC bijdraagt aan aandacht en het onderdrukken van impulsiviteit. Zowel de rol van cholinerge input naar de PFC als de rol van de glutamaterge verbindingen van de PFC worden hierbij bestudeerd in ratten en muizen met behulp van anatomisch, elektrofysiologisch en gedragsonderzoek. De grote overeenkomst in biologische principes tussen ratten, muizen en mensen zorgt ervoor dat de bevindingen gebruikt kunnen worden om de menselijke hersenen in gezondheid en ziekte beter te begrijpen en mogelijk therapieën te ontwikkelen om verslechtingen in aandacht en impulsiviteit te verbeteren.

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?

Dit onderzoek heeft als hoofddoel inzicht te verkrijgen in hoe de PFC betrokken is bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Dit zal bereikt worden door het onderzoeken van de rol van verschillende populaties projectieuronen in gedrag en het bestuderen van neuronen in hersenplakjes. Daarnaast willen we weten hoe dit gedrag en deze populaties beïnvloed worden door acetylcholine. De hypothese is dat verschillende neuronale populaties van de PFC betrokken zijn bij impuls-inhibitie of aandacht, afhankelijk van hun projectiegebied. Tot slot verwachten we een cruciale rol van acetylcholine in het 'voorbereiden' van het neuronale netwerk voor cognitieve belasting. Specifiek hebben we de volgende vragen:

1. Welke neuronale populaties in de PFC zijn betrokken bij aandacht en impuls-inhibitie?
2. Op welke tijdschaal binnen de gedragstaak zijn deze neuronale populaties actief?
3. Welke rol speelt acetylcholine in de PFC in aandacht en impuls-inhibitie?
4. Hoe beïnvloedt acetylcholine neuronale populaties in de PFC?

Voor dit onderzoek is financiering voor de komende vijf jaar. Verder is er binnen de afdeling veel ervaring met deze gedragsexperimenten en zijn alle technieken die hier aangevraagd worden opgezet en lopend. Voor elke stap in het onderzoek is er verder de nodige expertise in huis om dit succesvol uit te voeren, waarvan eerder werk gepubliceerd is in hoog aangeschreven tijdschriften als *Science*, *Nature Communications* en *eLife*. Er zijn op het lab vier PhD studenten aan het werk op dit project, evenals twee analisten en een post-doctorale onderzoeker. Waar mogelijk zal werk ondersteund worden door stage studenten en andere medewerkers van de afdeling.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

De PFC is een van de belangrijkste doelgebieden voor onderzoek naar aandacht en impuls-inhibitie door de *top-down* rol die deze speelt bij het moduleren van gedrag. Het voorgestelde onderzoek zal een bijdrage leveren aan de fundamentele kennis over de rol van heterogene celpopulaties in de PFC in cognitie. Dit is een uniek inzicht in een veld waarin vooral onderzoek is verricht naar de PFC als geheel, zonder onderscheid tussen populaties neuronen (subvraag 1). Door het gebruik van methodes als lesiestudies en farmacologie in het verleden is het onmogelijk een inschatting te maken van de tijdschaal waarin neuronale populaties actief zijn binnen gedrag. Met de voorgestelde methodes kunnen we accurate metingen verrichten naar de tijdschalen waarin groepen cellen actief zijn tijdens gedrag (subvraag 2).

De rol van prefrontale acetylcholine in gedrag is door middel van farmacologische studies en genetische deleties vastgesteld in aandacht. Hier willen we graag onderscheid maken tussen de rol van externe cholinerge input naar de PFC en de rol van lokale prefrontale cholinerge interneuronen in cognitie (subvraag 3). De rol van de lokale interneuronen in cognitie is bovendien op dit moment nog niet beschreven in de literatuur. Het voorgestelde onderzoek zou dus een uitstekende kans zijn dit voor het eerst te doen en duidelijkheid te verschaffen over de modulerende invloed van acetylcholine in de PFC tijdens cognitie. Met *in vitro* methodes kunnen we tot slot beschrijven hoe acetylcholine de activiteit van individuele cellen in de PFC beïnvloedt (subvraag 4).

Maatschappelijk belang

Hersenactiviteit in de PFC is aangetast in een breed spectrum van psychiatrische aandoeningen, waaronder schizofrenie, ADHD, de Ziekte van Alzheimer, depressie, angststoornissen en verslaving. De prevalentie van deze aandoeningen is 38%. Dit heeft ernstige gevolgen op zowel persoonlijk vlak maar ook op economie en sociologisch vlak. De World Health Organization (WHO) heeft voorspeld dat onbehandelde psychiatrische aandoeningen 13% uitmaken van de totale globale *burden of disease*. De WHO heeft ook ingeschat dat de verloren economische output door psychiatrische aandoeningen tot 12 biljoen US dollar bedraagt (WHO mental health action plan 2013-2020). Het is daarom cruciaal om een

manier te vinden om PFC activiteit in deze aandoeningen weer te normaliseren. Maar voor we zover zijn, zullen we eerst moeten begrijpen hoe neuronen in de PFC cognitie aansturen in gezondheid.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project is opgebouwd uit een viertal onderzoeksvragen:

1. Welke neuronale populaties in de PFC zijn betrokken bij aandacht en impuls-inhibitie?
 - A. In dit onderzoek is het belangrijk een goed beeld te krijgen van de verbindingen van de PFC met de relevante doelgebieden. Recentelijk zijn er nieuwe virale tracing methodes ontwikkeld die deze neuronale verbindingen preciezer kunnen laten zien. Om een beter beeld te krijgen van de PFC verbindingen willen we beginnen met tracing-experimenten. We willen tijdens de tracing experimenten met virale constructen onderscheid maken tussen projecties van de ventrale mPFC (vmPFC) en dorsale mPFC (dmPFC). In de literatuur is er voor verschillende doelgebieden een differentiële innervatie bekend vanaf de mPFC voor dorsale en ventrale subgebieden (Gabbott et al., 2005). Ook is er op gedrag een onderverdeling bekend tussen dmPFC en vmPFC (Passetti et al., 2002). Daarnaast willen we voor het uitvoeren van gedrag de werking van de beoogde virus constructies vaststellen in hersenplakjes met electrofysiologische methodes.
 - B. Als we een goed beeld hebben van de neuronale verbindingen van de PFC willen we gedragsexperimenten uitvoeren in ratten om de rol van deze neuronen in aandacht en impuls-inhibitie vast te stellen. We willen gebruik maken van een nieuwe chemogenetische techniek genaamd *DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)*. DREADDs zijn geconstrueerde receptoren die geactiveerd worden door biologisch inerte liganden (Roth, 2016). Deze receptoren kunnen met behulp van virale vectoren specifiek tot expressie worden gebracht in celpopulaties naar keuze. Tijdens een aandachtstaak, kunnen we door het toedienen van een biologische inert ligand populaties manipuleren om effecten op cognitie te testen.
 - C. Als we de timing van neuronale activiteit hebben vastgesteld [zie volgende onderzoeksvraag], willen we de noodzaak van deze temporele activatie van deze cellen causaal bewijzen met *optogenetica*. We willen met behulp van virale vectoren lichtgevoelige eiwitten tot expressie brengen in specifieke celpopulaties. De lichtgevoelige eiwitten (opsins) kunnen neuronen activeren of inhiberen op het in punt 2 gevonden tijdsinterval.
2. Op welke tijdschaal binnen de gedragstaak zijn deze neuronale populaties actief?

We zullen met behulp van de resultaten van subvraag 1 beslissen welke populaties projectieneuronen belangrijk zijn voor aandacht en impuls-inhibitie. Om meer inzicht te krijgen in de temporele betrokkenheid van deze cellen tijdens een gedragstaak stellen we de volgende experimenten voor:

 - A. *In vivo neurofysiologie*. Hierbij worden virale vectoren met een *optogenetische* eiwit (*opsin*) geïnjecteerd om specifieke celpopulaties in de PFC van ratten te labelen. Daarnaast worden elektrodes aangebracht in het brein. We kunnen nu met licht deze celpopulaties manipuleren en dus specifiek elektrische signalen oppikken van alleen de gelabelde groep cellen. Op basis van deze zogenaamde '*tagging*' kunnen we vervolgens deze specifieke cellen ook meten tijdens een gedragstaak om zo hun rol tijdens gedrag te ontcijferen.
 - B. *In vivo calcium-imaging*. Voor deze techniek worden met behulp van een virale vector *genetically encoded calcium indicators (GECIs)* ingebracht in specifieke celpopulaties in de PFC. Tegelijk implanteren we ook een optische vezel of lens om fluorescente signalen van de calcium indicator te kunnen detecteren. Dit stelt ons in staat om de neuronale activiteit van hele populaties tegelijk te kunnen meten tijdens een gedragstaak.
3. In transgene *Chat-cre* ratten kunnen we selectief met virale vectoren het cholinerge systeem beïnvloeden. We willen zowel cholinerge projecties vanuit het basaal voorbrein naar de PFC als

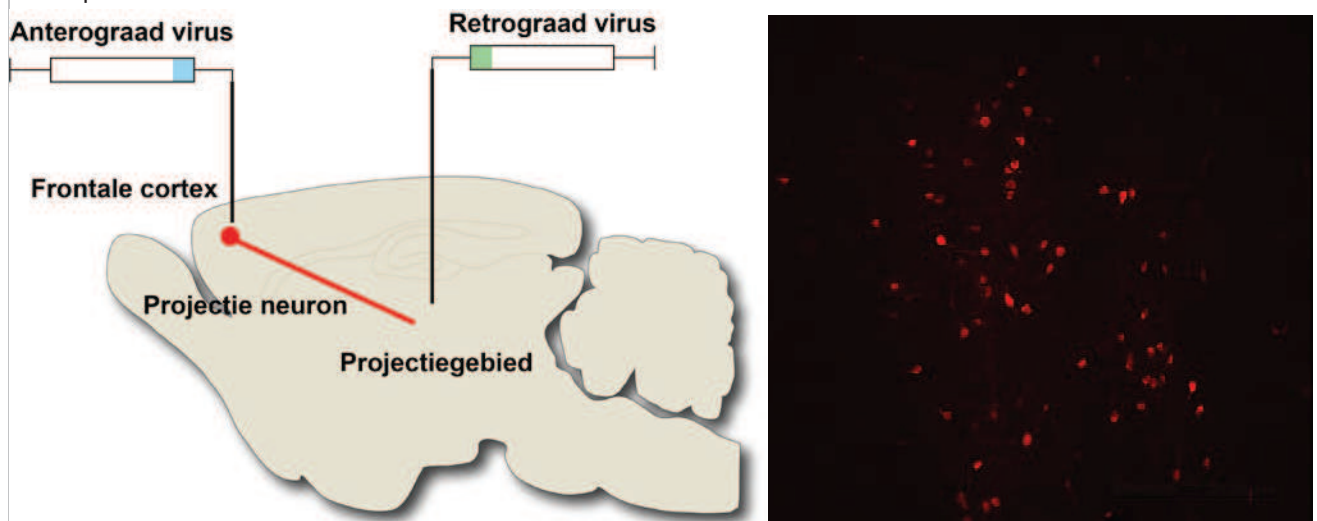
cholinerge interneuronen in de PFC moduleren met DREADDs en de activiteit meten met neurofysiologie en *in vivo calcium imaging*. Tot slot willen we de causale rol van deze temporele activatie benadrukken door controle-experimenten met optogenetica. Alle bovengenoemde methodes zullen gebruikt worden voor het beantwoorden van deze vraag.

4. Hoe beïnvloeden inputs naar de mPFC connectiviteit en plasticiteit?
In hersenplakjes zullen we gaan kijken hoe verschillende inputs de plasticiteit en connectiviteit tussen neuronen in de mPFC beïnvloed. Door gebruik van verschillende opsins is het mogelijk inputs te activeren of te remmen. We willen onderzoeken hoe glutamaterge inputs en cholinerge inputs de activiteit in de mPFC beïnvloed.

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. *Rat anatomische tracing experimenten*: ratten ondergaan een operatie met virusinjectie (figuur 1) waarin met behulp van fluorescente eiwitten projectieneuronen of cholinerge interneuronen worden gelabeld.

Rat electrofysiologische experimenten: om virusconstructen die in gedrag worden gebruikt te testen voor goede expressie en functionaliteit ondergaan ratten een operatie met virusinjectie (figuur 1). Zodra het virus tot expressie is gekomen worden neuronen in de hersenplakjes van de ratten gemeten met behulp van elektrodes.



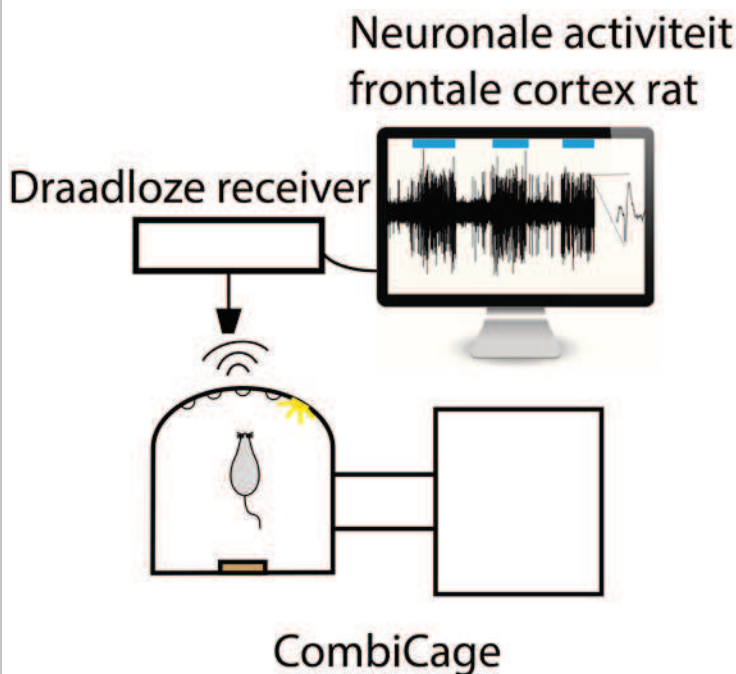
Figuur 1. (links) Voorbeeld injectie protocol waarbij een retrograad virus in een projectiegebied geïnjecteerd wordt en een anterograad virus in de frontale cortex waardoor een specifieke groep projectieneuronen gelabeld worden met een opsine of DREADD receptor (rode stippen, rechts).

Rat gedrag: ratten ondergaan een operatie waarbij een DREADD-receptor, opsin of GECI tot expressie gebracht zal worden in de PFC. Na herstel zullen dieren getraind worden in de *5-choice serial reaction time task* (Bari et al., 2008; Rummelink et al., 2017). Ratten worden getraind in operante kooien die aan één wand een magazijn bevatten waarin pellets als beloning gegeven worden (zie figuur 2 voor voorbeeld opstelling). In de andere wand zitten vijf uitsparingen (nose poke holes) met LEDs erin. Ratten worden getraind te reageren op een LED in één van de nose poke holes: Reageert de rat correct dan wordt dit beloond met een pellet. Wanneer de rat geen respons maakt, of een incorrecte of premature respons, dan wordt dit bestraft met een time-out. We gaan ratten trainen op een conventionele manier of in homepage systemen waarbij de ratten zelf bepalen wanneer ze de taak uitvoeren. Wanneer de ratten stabiel zijn in dit gedrag zullen ze getest worden. Voedselrestrictie wordt uitgevoerd om de dieren te motiveren.

DREADDs: ratten die DREADD-receptoren hebben in de PFC zullen getest worden door injecties met biologisch inerte ligands voor de receptoren.

Imaging / neurofysiologie / optogenetica: ratten met een implantaat voor neurofysiologie, optogenetica of imaging zullen getest worden door aansluiting aan een lichtkabel en/of recording systeem.

Muizen elektrofysiologie: Omdat er in muizen veel meer genetische tools beschikbaar zijn, is het mogelijk verschillende celtypen te labelen met fluorescerende markers, of tools aan te brengen die de cel activiteit remmen of stimuleren. Met 1-4 elektroden kunnen we de activiteit van neuronen meten in hersenplakjes waarbij we door middel van licht of farmaca de inputs kunnen remmen of stimuleren.



Figuur 2. Schematische weergave van een voorbeeld van een gedragsofstelling waarin de rat getraind en getest wordt (CombiCage). De rat wordt getraind in een thuishok situatie waarbij hij dagelijks automatisch getraind wordt in de testkooi. Voor testen wordt hij aangesloten op het calcium imaging of elektrofysiologie systeem en via de computer wordt neuronale en gedragsactiviteit gemeten. Of hij wordt geïnjecteerd met een agonist voor de DREADD receptor.

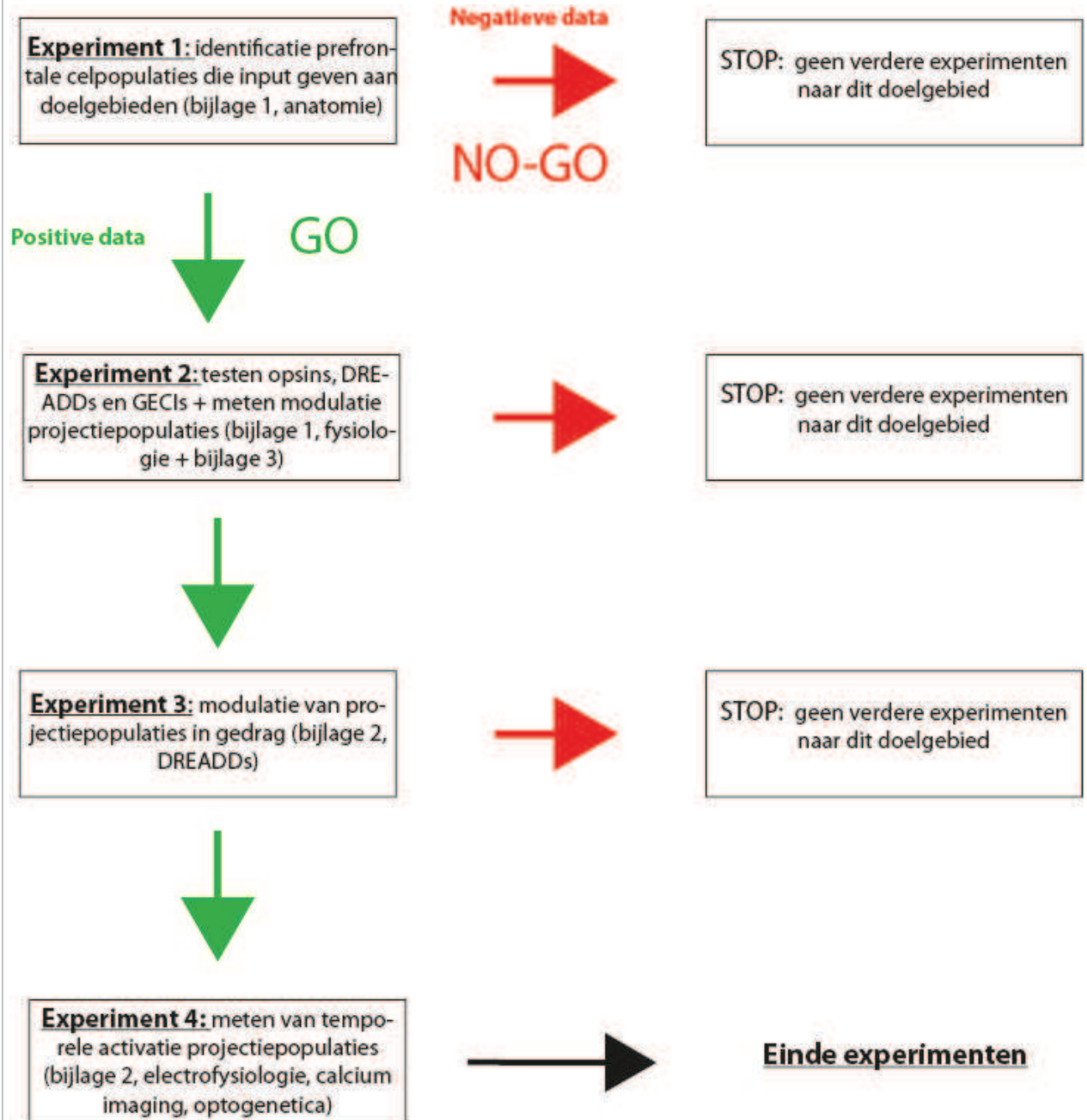
3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het overkoepelende doel van de studie is het ontrafelen van de rol van verschillende populaties pyramidaalcellen in de mPFC in cognitie en hoe deze gemoduleerd worden door acetylcholine. Door de activiteit van cellen te meten tijdens gedrag kunnen we meten hoe acetylcholine tijdens gedrag beïnvloed. Vervolgens willen we in hersenplakjes uitzoeken wat voor effect acetylcholine heeft op de activiteit en connectiviteit tussen cellen. Hierbij willen we gebruik maken van zowel muizen als ratten. Ratten presteren beter tijdens complexe gedragstaken terwijl voor fysiologische experimenten muizen het voordeel hebben dat er veel genetisch gemodificeerde lijnen beschikbaar zijn waardoor er cellen een marker hebben en/of specifiek de activiteit beïnvloedt kan worden door middel van licht of farmaca.

Na elke stap in het onderzoek zijn keuzemomenten waarop bepaald wordt wat de koers van het project wordt. Door te starten met tracing en het testen van de virus-constructen voor gedrag en/of elektrofysiologie kunnen we doelgebieden elimineren waarbij we geen connecties met de prefrontale cortex vinden of waarin de opsins of DREADD receptoren in vitro niet werken.

Door vervolgens de beoogde celpopulaties in gedrag uit te schakelen met DREADDs krijgen we een beeld van de bijdrage van elke celpopulatie in aandacht en impuls-inhibitie. *Alleen* de celpopulaties die bijdragen aan dit gedrag zullen verder onderzocht worden met neurofysiologische of imaging methodes. Tot slot kunnen we heel specifiek met optogenetica tijdens bepaalde tijdsintervallen deze populaties

uitzetten of activeren. Dit gebeurt dus alleen in de celpopulaties die sterke verbindingen laten zien met de mPFC, waarin de virus-constructen werken en waarbij inhibitie van deze populaties in de 5-choice taak een effect laat zien op aandacht en impuls-inhibitie.



Schema 1. Overzicht van de volgorde van experimenten binnen het onderzoek en de bijbehorende keuzemomenten. Bijvoorbeeld: na het uitvoeren van anatomische tracing studies (bijlage 1) wordt vastgesteld naar welke doelgebieden de prefrontale cortex projecteert. Alleen deze populaties neuronen in de prefrontale cortex die projecteren naar bepaalde doelgebieden ('projectiepopulaties') worden verder onderzocht. Doelgebieden die geen input krijgen van de frontale cortex worden voor verdere stappen uitgesloten.

Literatuurlijst gebruikte referenties CCD aanvraag.

- Bari, A., Dalley, J. W., and Robbins, T. W. (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat. Protoc.* 3, 759–67. doi:10.1038/nprot.2008.41.
- Brown, K. J., and Grunberg, N. E. (1995). Effects of housing on male and female rats: Crowding stresses males but calms females. *Physiol. Behav.* 58, 1085–1089. doi:10.1016/0031-9384(95)02043-8.
- Freedman, R. (2014). α 7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for Cognitive Enhancement in Schizophrenia. *Annu. Rev. Med.* 65, 245–261. doi:10.1146/annurev-med-092112-142937.
- Friedman, A., Homma, D., Gibb, L. G., Amemori, K., Rubin, S. J., Hood, A. S., et al. (2015). A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell* 161, 1320–1333. doi:10.1016/j.cell.2015.04.049.
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., and Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* 492, 145–177. doi:10.1002/cne.20738.
- Hoover, W. B., and Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–79. doi:10.1007/s00429-007-0150-4.
- Jentsch, J. D., and Taylor, J. R. (2003). Sex-related differences in spatial divided attention and motor impulsivity in rats. *Behav. Neurosci.* 117, 76–83. doi:10.1037/0735-7044.117.1.76.
- Parnaudeau, S., O'Neill, P.-K., Bolkan, S. S., Ward, R. D., Abbas, A. I., Roth, B. L., et al. (2013). Inhibition of mediodorsal thalamus disrupts thalamofrontal connectivity and cognition. *Neuron* 77, 1151–62. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.038.
- Passetti, F., Chudasama, Y., and Robbins, T. W. (2002). The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cereb. Cortex* 12, 1254–1268. doi:10.1093/cercor/12.12.1254.
- Rommelink, E., Chau, U., Smit, A. B., Verhage, M., and Loos, M. (2017). A one-week 5-choice serial reaction time task to measure impulsivity and attention in adult and adolescent mice. *Sci. Rep.* 7, 42519. doi:10.1038/srep42519.
- Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.040.
- Sarter, M., Lustig, C., and Taylor, S. F. (2012). Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* 62, 1544–1553. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.001.

Empty rectangular box for drawing or notes.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Rat anatomische en fysiologische studies
2	Ratten gedrag
3	Muizen elektrofysiologie
4	
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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De rol van de frontale cortex in aandacht en impulsiviteit
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Hersenenwetenschappen, fundamenteel, ratten, muizen, aandacht, impulsiviteit

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Aandacht en concentratie zijn van groot belang om normaal te functioneren in het dagelijks leven. Naast psychiatrische aandoeningen als aandachtstekortstoornis (ADD) en aandachtstekort-hyperactiviteitstoornis (ADHD) is aandacht vaak ook aangetast in andere, veel voorkomende ziektes zoals de ziekte van Alzheimer of depressie. We weten dat een aantal hersengebieden nauw betrokken zijn bij aandacht: met name de prefrontale cortex. Deze bestaat uit veel verschillende onderdelen, ontvangt informatie uit een groot deel van het brein en stuurt dit ook weer naar een groot deel van het brein door.</p> <p>We weten dat dieren en mensen slechter aandacht aan specifieke gebeurtenissen in hun omgeving kunnen besteden als de prefrontale cortex minder goed functioneert. Het is nog niet duidelijk hoe alle verschillende</p>
---	--

onderdelen met elkaar samenwerken, en ook hoe alle inkomende en uitgaande informatie van belang is. Daarom willen we in dit project kijken hoe de prefrontale cortex precies werkt als een dier, en uiteindelijk de mens, ergens de aandacht op richt.

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

Na afloop van dit project verwachten we te weten hoe de verschillende onderdelen van de prefrontale cortex van invloed zijn op aandacht, en weten we ook wat daarin de rol is van de hersengebieden die informatie uitwisselen met de prefrontale cortex. Wetenschappelijk gezien is dit nog onbekend terrein: tot nu toe heeft onderzoek zich beperkt tot het stilleggen van de hele prefrontale cortex. Wij willen dus verder gaan door de functionele populaties van de frontale cortex te karakteriseren. Het maatschappelijk belang is groot, doordat we met completere kennis over de werking van de prefrontale cortex gericht op zoek kunnen naar een behandeling voor aandachtsstoornissen, en symptoombestrijding in ziektes waar aandacht aangetast is. Daarnaast leren we meer over de manier waarop de hersenschors georganiseerd is: informatie die vrijwel zeker toepasbaar is op andere delen van de schors.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

We gebruiken hier zowel ratten als muizen, en we verwachten de volgende aantallen nodig te hebben:
Ratten: maximaal 1780
Muizen: maximaal 2090

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

De proefdieren zullen een operatie ondergaan, waarbij een virus wordt geïnjecteerd en ze in sommige gevallen een klein implantaat in het brein krijgen. Daarna worden ze getraind in een aandachtstaak. Tijdens de training worden de dieren individueel gehuisvest en krijgen ze weinig eten, om voldoende gemotiveerd te zijn om de gedragstaak uit te voeren, waar ze voedsel mee verdienen. De dieren hebben onbeperkt toegang tot drinken. Tijdens de taak zelf worden de dieren ofwel geïnjecteerd, ofwel aangesloten aan een kabeltje om hersenactiviteit te meten.

Deze handelingen worden ingeschaald als matig ongerief. De dieren worden verder elke dag gecontroleerd en het verblijf in de kooi wordt zo aangenaam mogelijk gemaakt. Aan het einde van het experiment, of bij het voortijdig bereiken van een humaan eindpunt, worden de dieren gedood.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Het geschatte ongerief is maximaal matig voor 100% van de dieren.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden na de proeven gedood om de hersenen te kunnen bestuderen.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom

De fundamentele kennis over de werking van de prefrontale cortex die we uit dit soort experimenten halen, kunnen we niet uit onderzoek bij mensen krijgen. Methodes als fMRI en PET hebben niet de resolutie om specifieke hersencellen of kleine groepen cellen bij een levend mens vast te leggen. We kunnen het ook niet met stamcellen of computersimulaties

proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

onderzoeken: met geen van beide methoden is het nu mogelijk een levend wezen te simuleren.

Het onderzoek kunnen we goed bij ratten en muizen uitvoeren, omdat we daar wel alle hersengebieden en losse hersencellen goed kunnen bereiken. Ratten en muizen lijken evolutionair gezien dusdanig veel op mensen, dat de kennis die we uit dit onderzoek halen goed vertaalbaar is.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Door gebruik te maken van ons werkplan met een aantal keuzemomenten, in elke fase van het onderzoek, is het makkelijk om in een vroeg stadium van het project te besluiten of het voor het onderzoek zin heeft om door te gaan met een bepaalde celpopulatie of niet. Hiervoor kijken we eerst naar de meest veelbelovende richtingen: dat kunnen verbindingen naar andere hersengebieden zijn, of juist inkomende informatie in het brein, of een subonderdeel van de prefrontale cortex. Daarnaast hebben we ook per experiment berekend wat de kleinst mogelijke groepsgrootte is om met redelijke zekerheid te zeggen of een experimenteel resultaat wel of niet van belang is. Tenslotte heeft onze onderzoeksgroep veel expertise met soortgelijke experimenten, waardoor de uitval van dieren ook nog beperkt zal zijn, en werken we samen met andere onderzoeksgroepen die ook veel ervaring hebben met dit type onderzoek.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

We gaan onderzoeken hoe de prefrontale cortex werkt als er gericht aandacht aan iets wordt besteed. Ratten zijn ideaal voor gedragsonderzoek, omdat ze het vermogen hebben om aandachtstaken binnen afzienbare tijd te leren, het rattenbrein grote overeenkomsten heeft met dat van mensen, en omdat voor ratten ook diverse virale gereedschappen beschikbaar zijn die we nodig hebben voor gedragsonderzoek. Daarnaast willen we muizen gebruiken omdat er transgene muislijnen beschikbaar zijn die het mogelijk maken om verschillende prefrontale celtypen te kunnen identificeren en de activiteit van deze cellen te kunnen remmen of stimuleren.

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

Getrainde wetenschappers voeren de operaties uit. Alle dieren worden onder diepe anesthesie gebracht voor aanvang van operaties en tijdens de operatie wordt pijnstilling gegeven aan de dieren om het ongerief zo laag mogelijk te houden. De dieren zullen eens per dag worden gecontroleerd. Ook zijn er humane eindpunten gedefinieerd om onnodig lijden te voorkomen, maar de kans hierop is klein (<3%). Voordat er meer dan matig optreedt worden de humane eindpunten toegepast.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

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.
- 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="1"/> | <input type="text" value="Rat anatomische en fysiologische studies"/> |
- 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.

Als eerste stap willen we vaststellen waar de projectieuronen zich binnen de mPFC bevinden. Daarnaast willen we weten of onze verschillende virale constructen goed tot expressie komen. Anders is het immers niet mogelijk om gedragsveranderingen teweeg te brengen. We kunnen dit doen door een retrograad virus in de doelgebieden te infuseren. Dit virus zal cre-recombinase tot expressie brengen in celpopulaties die projecteren naar dit doelgebied, in dit geval dus ook de mPFC. Vervolgens kunnen we tijdens dezelfde operatie een virus infuseren in de mPFC, welke een fluorescent eiwit tot expressie brengt in alleen die cellen die naar voorgenoemd doelgebied projecteren. Wanneer de virussen tot expressie zijn gekomen worden de ratten gedood en het brein geïsoleerd om de anatomie verder te bestuderen in hersenplakjes. Hier kunnen we kwalitatief bepalen of er goede expressie is.

Als tweede willen we door een opsin, GECI of DREADD-receptor tot expressie te brengen in de mPFC subpopulatie de fysiologische effecten van deze ingebouwde eiwitten op neuronale activiteit meten. Hierdoor kunnen we beter begrijpen wat de effecten van onze manipulaties in het intacte dier zijn. Dit doen we door na virusinfectie het dier te perfuseren en in de plakjes van het brein individuele cellen te meten, met een glazen electrode. Hier kijken we onder andere naar veranderingen in membraanpotentiaal, vuurfrequentie en communicatie met andere neuronen.

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.

Een of twee weken na levering zullen de ratten eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfecteerd. Deze operatie zal maximaal twee uur duren. De dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen, na anesthesie in een stereotact geplaatst worden. Er zullen gaten geboord

worden in de schedel boven het doelgebied en boven de mPFC. Met een zeer fijne, steriele pipet worden de virussen geïnfuseerd. Na herstel zal het dier in de thuishooi verblijven tot het virus tot expressie is gekomen. Dit zal per virus variëren van 3 weken tot maximaal 4 maanden. Hierna zal het dier geperfuseerd worden.

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

De anatomie-experimenten zijn kwalitatieve proeven dus de uitkomsten zijn moeilijk uit te drukken in statistische significanties. We gaan uit van 3 a 4 ratten per doelgebied (Friedman et al., 2015). We willen graag retrograde infusies en anterograde infusies doen en expressie van opsins en DREADD receptoren testen voor we verder gaan met gedrag. Schattingen voor aantallen dieren voor elektrofysiologische experimenten zijn bepaald door ervaring hier op de afdeling met deze techniek en pilot experimenten. In de literatuur zien we dat 10-15 cellen per deelvraag voldoende zijn voor een onderbouwd antwoord (Parnaudeau et al., 2013).

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we ratten. Dit is nodig voor de anatomie en fysiologie experimenten aangezien we de met anatomie gevonden projecties willen testen in gedrag met deze diersoort. We hebben voor de rat gekozen vanwege de complexe aard van de gedragstaak en de technische moeite die de experimenten zouden kosten in muizen.

We zullen alleen mannetjesratten gebruiken van de stam Long Evans of Chat-Cre transgene ratten met Long Evans genetische achtergrond van eigen fok voor onderzoek naar cholinerge populaties. We willen alleen mannetjesratten gebruiken omdat gemeten parameters in de 5CSRTT verschillen voor mannetjes en vrouwtjesratten (Jentsch et al., 2003). Ook is de gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de hanteerbaarheid ~~hebben~~ van mannelijke ratten. Daarnaast is uit de literatuur bekend dat individuele huisvesting voor vrouwelijke dieren stressvoller is dan voor mannelijke dieren. Gebaseerd op deze resultaten heeft het dus voorkeur om uitsluitend mannelijke ratten te gebruiken vanwege de noodzaak dieren individueel te huisvesten (Brown et al., 1995). Ratten zullen worden besteld op een leeftijd van ongeveer 7 weken. Experimenten kunnen tot ongeveer 4 maanden na aankomst van de dieren duren, afhankelijk van de expressie tijd van de gebruikte virussen.

We willen tijdens de tracing experimenten met virale constructen onderscheid maken tussen projecties van de ventrale mPFC (vmPFC) en dorsale mPFC (dmPFC). In de literatuur is er voor verschillende doelgebieden en differentiële innervatie bekend vanaf de mPFC voor dorsale en ventrale subgebieden (Gabbott et al., 2005). Ook is er op gedrag een onderverdeling bekend tussen dmPFC en vmPFC (Passetti et al., 2002). Zie tabel 1 voor de berekening van de groeps groottes voor deze experimenten. De (x2) betekent dat we de populaties in zowel de dmPFC als vmPFC gaan bestuderen.

Belangrijk bij het lezen van de tabel is dat dit om een **maximaal** aantal dieren gaat. Immers, als we tijdens de initiële tracing experimenten geen expressie zien van het virus heeft het geen zin om verder te gaan met opto / DREADD expressie testen of fysiologische experimenten.

We gaan 5 experimenten doen op 10 verschillende projecties voor de dmPFC of vmPFC. Dit zijn projectiegebieden waarvan in de literatuur sterke aanwijzingen zijn dat deze verbonden zijn met de prefrontale cortex en betrokken zijn bij cognitie. We weten van literatuur (Friedman et al., 2015) dat we ongeveer 3 a 4 dieren nodig hebben in een groep om betrouwbaar expressie te testen of duidelijke anatomische conclusies te trekken. Aangezien we precieze virus-infusies op twee verschillende coördinaten uitvoeren, het doelgebied en in de PFC, verwachten we op basis van vorige experimenten in ons lab een uitval van ongeveer 30%. Dit betekent dat we 5 dieren per groep nodig hebben om betrouwbaar conclusies te kunnen trekken.

Dieren per experiment:

10 (projecties) x **2** (dorsale en ventrale PFC) x **5** (groeps grootte per experiment) = **100 ratten per experiment.**

Voor 5 experimenten totaal: 100 * 5 = 500 ratten (zie Tabel 1)

Tabel 1. Dierverbruik in voorgestelde experimenten.

Experiment	Groepen	N / groep	N totaal
1. Tracing	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2, dmPFC + vmPFC)	5	10*5*2=100
2. Testen opsin	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
3. Ephys opsin	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
4. DREADD	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
5. GECI	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
			$\Sigma_N=500$

MDT: mediodorsaal thalamus / BLA: basolaterale amygdala / DS: dorsaal striatum / VS: ventraal striatum / SC: superior colliculus / FOF: frontal orienting fields / ILN: intralaminaire nucleus van de thalamus / VTA: ventral tegmental area / BF: basale voorbrein / Ach-INT: cholinerge interneuronen PFC.

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:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Op basis van deze literatuur hebben we zorgvuldig afgewogen projectiegebieden gekozen en zeer veel andere projectiegebieden van de mPFC weg gelaten. Daarnaast gaan we trapsgewijs te werk waarbij er per stap het gebruik van groepen ratten afvallen doordat sommige groepen niet betrokken zullen zijn in de gemeten parameters van onze gedragstaak. Tot slot zijn de gebruikte virussen de nieuwste technologie waardoor de grootste hoeveelheid neuronen geïnfecteerd worden. Hierdoor is het gemeten effect zo groot mogelijk en kunnen dieren bespaard worden.

Verfijning:

De operatie en perfusie die de dieren zullen ondergaan wordt uitgevoerd onder diepe anesthesie. Ook zal er waar nodig analgesie gegeven worden om ongerief zoveel mogelijk te verminderen. Op de afdeling heeft het personeel veel ervaring met de operatie en met perfusies.

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijden adequate peri-operatieve pijnstilling worden toegepast. Verder zullen alle operaties en perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie. Na een operatie worden de dieren 2 dagen extra gecontroleerd op gewicht en gezondheid en zonodig pijnbestrijding toegediend.

Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle GGO dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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.

Er is in het verleden onderzoek gedaan naar projectieuronen van de mPFC (Gabbott et al., 2005). In dit paper gebruiken ze echter grote hoeveelheden van een specifieke retrograde tracer. Deze methode heeft het nadeel dat er geen celspecifieke conclusies getrokken kunnen worden en dat hele grote gebieden in het brein met de tracer geïnfuseerd zijn. Dit is lastig voor kleine gebieden zoals de mediodorsala thalamus. Door middel van nieuwe, specifiekere technieken kunnen we zeker zijn van precieze, populatie-specifieke tracing.

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 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.

De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden en tijdens de operatie bevindt het dier zich onder algehele anesthesie. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

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.

De volgende humane eindpunten zullen worden gehanteerd:

- Verlies van lichaamsgewicht: > 15% in 24 uur.
- Bewegingsloosheid: als de rat na herstel van de operatie een suppressie van activiteit vertoont in zijn thuishok wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de rat voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Handeling	Inschaling	Duur
Anesthesie	licht (100%)	2 uur
Virusinjectie	matig (100%)	2 uur
Perfusie onder verdoving	terminaal (100%)	15 minuten

Het cumulatieve ongerief is 'matig' voor 100% van de dieren.

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.

De huidige anatomische en elektrofysiologische technieken laten niet toe om in een intact brein te werken. Hierdoor zullen we het brein uit de rat moeten halen en dit kan niet anders dan door de dieren te doden.

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.
- 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="Rat 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.

In dit onderzoek kijken we of en wanneer bepaalde mPFC projectieneuronen betrokken zijn in aandacht en impuls-inhibitie.

Eerst kijken we of de verschillende projecties een rol spelen in aandacht in impuls-inhibitie. We doen dit met chemogenetische manipulatie van specifieke neuronale populaties tijdens de 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT), een aandachts en impuls-inhibitie taak.

We injecteren tijdens een operatie twee virussen. In het doelgebied infuseren we een retrograad virus welke cre-recombinase tot expressie brengt in de afferente gebieden. Ook infuseren we een virus in de PFC met de DREADD receptor, welke afhankelijk is van de expressie van cre. Deze procedure geeft ons de mogelijkheid om in zeer specifieke populaties een virus tot expressie te brengen.

Na herstel van de operatie worden ze getraind in de 5-CSRTT. Bij aanvang van de training worden de ratten ook op voedselrestrictie gezet. Hiervoor zullen de ratten genoeg gehandeld worden om te wennen aan de onderzoekers.

Als de ratten de taak goed genoeg kunnen begint de testfase waarbij gekeken wordt naar de individuele prestatie van de rat in de taak. De dieren worden eerst een aantal dagen gehabitueerd aan *i.p. of s.c.* injecties met de dragervloeistof van de DREADD agonist. Na habituatie aan de injecties begint het daadwerkelijke experiment, waarbij we afwisselend de ratten injecteren met een ligand voor een DREADD-receptor of saline of alleen fixeren. We verwachten dat de modulatie van specifieke projectieneuronen met DREADDs leidt tot veranderingen in de prestatie op de taak.

In samenhang met de resultaten in de chemogenetische experimenten hierboven besluiten we of we de celpopulaties verder willen bestuderen. Als we een verandering in performance in de 5-CSRTT zien, gaan we kijken wanneer de celpopulatie precies actief is tijdens de taak. Dit doen we door middel van elektrofysiologie en *calcium imaging* in het bewegende dier.

In electrofysiologische experimenten injecteren we tijdens een operatie weer de twee verschillende virussen (een retrograad en een opsin) zodat we expressie krijgen van een modulerend opsin in de specifieke celpopulatie die we willen onderzoeken. Tijdens dezelfde operatie krijgt de rat ook een headstage geïmplanteerd, die onder andere elektroden en een lichtbron bevat, zodat we elektrische activiteit in het brein kunnen meten, en de opsins met licht kunnen bereiken. Na de operatie mogen de ratten herstellen voordat ze naar de gedragsruimte gaan en daar worden getraind in de 5-CSRTT. Als de ratten getraind zijn, kunnen we elektrische signalen van de neuronen meten en zodoende zien wanneer ze actief zijn. Met behulp van de specifieke labeling van projectieneuronen met opsines kunnen we de activiteit van deze groep volgen gedurende de taak.

Via calcium imaging kunnen we daarnaast ook kijken naar de gehele populatie in een bepaald gebied. De operatie is qua virussen wederom hetzelfde, met in dit geval als doel om door middel van een retrograad virus een GECI op de juiste plek tot expressie te brengen. De ratten krijgen hier een optische vezel of een lens geïmplanteerd, en worden na de operatie individueel gehuisvest. Ze worden vervolgens getraind in de 5-CSRTT, en daarna gehabitueerd aan kabels, die we aan de optische vezel kunnen aansluiten en zodoende de vrijkomende fluorescentie van de GECI naar een detector kunnen geleiden. De temporele resolutie van calcium imaging is weliswaar een stuk kleiner dan die van elektrofysiologie, maar daartegenover staat dat we met imaging wel een veel groter aantal cellen kunnen meten. Het is daarom dan ook essentieel dat we allebei de methoden gebruiken om vast te stellen wanneer de neuronale populatie actief is.

Als we vinden dat de celpopulatie die we bekijken inderdaad actief is tijdens de 5-CSRTT, kunnen we met grotere precisie de neuronen gaan manipuleren. Dat doen we door middel van optogenetica. De operatie is wederom redelijk hetzelfde als voor elektrofysiologie en imaging: we injecteren weer twee virussen, waarbij een retrograad virus ook weer zorgt voor expressie van een opsin in de juiste populatie. Daarna implanteren we twee lichtbronnen in het targetgebied. Na herstel van de operatie worden de ratten getraind in de 5-CSRTT. De ratten worden hiertoe aangesloten op een kabel, waarmee we licht op de juiste hersencellen schijnen en hun activiteit daarmee beïnvloeden. Nu we weten dat de cellen actief zijn tijdens de taak, verwachten we dat als we ze op precies de goede momenten (zoals gezien bij elektrofysiologie en imaging) manipuleren, we een verandering in performance in de 5-CSRTT gaan zien.

We zullen ons in eerste instantie vooral richten op een aantal gebieden waarvan we weten dat ze van invloed zijn op aandacht en impuls-inhibitie, of vergelijkbare cognitieve capaciteiten zoals cognitieve flexibiliteit. Deze gebieden zijn in bijlage 1 ook al benoemd.

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 ratten zullen na een tot twee weken acclimatisatie eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfuseerd. Deze operatie zal maximaal 2 uur duren voor alleen virus injecties en maximaal 4-6 uur wanneer er een implantaat aangebracht moet worden. Alle dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen na anesthesie in een stereotact geplaatst worden. Er zullen gaten geboord worden in de schedel boven het doelgebied en boven de mPFC. Met een zeer fijne, steriele pipet worden de virussen geïnfuseerd. Wanneer er naast een virusinjectie ook een implantaat aangebracht wordt zal deze zorgvuldig met tandartsceмент op zijn plek gezet worden. Hierna zal het dier een week herstellen waarna het verplaatst wordt naar de testomgeving. Hier zullen de dieren tot maximaal een week acclimatiseren. Hierna worden de ratten getraind in de 5-CSRTT met een duur van ongeveer een tot acht weken tot ze stabiel presteren. Tijdens de training leren ratten om te reageren op een van de 5 lichtjes in de muur van de gedragskooi die op een random plek aangaat na een aantal seconden. Wanneer de rat de hier goed op reageert verdient hij een pellet. Het aantal correcte, incorrecte, premature responses en de snelheid van responses gebruiken we als maat van aandacht en impuls-inhibitie. Hierna zullen de dieren worden geperfuseerd om in hersenplakjes te onderzoeken of het virus en implantaat op de juiste plek zitten. In totaal zullen dieren maximaal 6-7 maanden in het experiment zitten vanaf het moment van levering tot

perfusie. Hierbij moet wel bedacht worden dat hier erg veel variatie in kan zitten, afhankelijk van tijd voor virusexpressie en testdagen.

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

Afhankelijk van het experiment krijgen we verschillende soorten uitkomsten. In de experimenten waarin we hersenactiviteit manipuleren is onze output het resultaat in de 5-CSRTT. Hier gebruiken we ANOVA om significante verschillen tussen groepen en tussen verschillende condities in hetzelfde dier te bepalen. In experimenten waar we kijken naar neuronale activiteit bepalen we de activiteit van individuele neuronen of populaties tijdens de 5-CSRTT.

In onze ervaring is er in proefdiermodellen voor complexe cognitie en diergedrag in het algemeen een grote mate van variatie. We hebben daarom 16 ratten per experimentele groep voor manipulatie en activiteitsmetingen van neuronale populaties toegewezen. In dit aantal hebben we ook alle eventuele uitval van proefdieren meegenomen, zoals bijvoorbeeld mislukte virusinfecties of operaties en ratten die de taak niet aanleren. Uit ervaring weten we dat deze uitval ongeveer 20% is. We houden daarmee per groep ten minste 12 dieren over voor statistische analyse, wat genoeg is om een statistisch significant effect te vinden, ook als we de natuurlijke variatie in gedragsonderzoek in acht nemen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we ratten. Dit is nodig voor de anatomie en fysiologie experimenten aangezien we de met anatomie gevonden projecties willen testen in gedrag met deze diersoort. We hebben voor de rat gekozen vanwege de complexe aard van de gedragstaak en de technische moeite die de experimenten zouden kosten in muizen.

We zullen alleen mannetjesratten gebruiken van de stam Long Evans of Chat-Cre transgene ratten met Long Evans genetische achtergrond van eigen fok voor onderzoek naar cholinerge populaties. Omdat de gemeten parameters onder invloed kunnen zijn van oestrogenen willen we voorkomen dat de oestrogeencyclus van vrouwen invloed heeft op onze resultaten. Ook is de gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de handelbaarheid hebben van mannelijke ratten. Ratten zullen worden besteld op een leeftijd van ongeveer 7 weken. Experimenten kunnen tot ongeveer 6 maanden na aankomst van de dieren duren, afhankelijk van de expressietijd van de gebruikte virussen.

We zullen ons in eerste instantie vooral richten op een aantal gebieden waarvan we weten dat ze van invloed zijn op aandacht en impuls-inhibitie, of vergelijkbare cognitieve capaciteiten zoals cognitieve flexibiliteit. Deze gebieden zijn in Bijlage 1 (tracing-experimenten) ook al benoemd. Voor al deze targetgebieden kijken we eerst of we met DREADDs iets zien, op basis daarvan kijken we naar de timing van activiteit met elektrofysiologie en imaging, en aan de hand van die resultaten gaan we voor specifieke manipulatie met optogenetica.

Door deze trapsgewijze aanpak proberen we het aantal proefdieren zo laag mogelijk te houden. In Tabel 1 staat het aantal dieren dat we denken te gebruiken voor al deze experimenten, maar let op dat dit dus om het absolute maximum aantal dieren gaat.

Tabel 1. Dierverbruik in voorgestelde experimenten.

Experiment	Groepen	N/groep	N totaal
1. Chemogenetics	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (2x, dorsale en ventrale PFC)	16	10 (aantal projecties) *16 (N/groep)*2 (dm + vm PFC) =320

2. In vivo elektrofysiologie	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
3. In vivo calcium imaging	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
4. Optogenetica	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
			ΣN=1280

MDT: mediodorsaal thalamus / BLA: basolaterale amygdala / DS: dorsaal striatum / VS: ventraal striatum / SC: superior colliculus / FOF: frontal orienting fields / ILN: intralaminaire nucleus van de thalamus / VTA: ventral tegmental area / BF: basale voorbrein / Ach-INT: cholinerge interneuronen PFC.

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 voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Op basis van deze literatuur hebben we zorgvuldig afgewogen projectiegebieden gekozen en zeer veel andere projectiegebieden van de mPFC weg gelaten. Daarnaast gaan we trapsgewijs tewerk waarbij er per stap het gebruik van groepen ratten afvallen doordat sommige groepen niet betrokken zullen zijn in de gemeten parameters van onze gedragstaak. De gebruikte virussen zijn de nieuwste technologie waardoor de grootste hoeveelheid neuronen geïnfecteerd worden en het gemeten effect zo groot mogelijk is. Daarnaast hebben we voor de elektrofysiologie en calcium imaging de nieuwste technieken waarbij we zoveel mogelijk cellen tegelijkertijd kunnen meten en hierdoor de power van de studie toeneemt. Tot slot hebben we geen extra dieren voor controlegroepen nodig omdat we kunnen controleren voor licht (optogenetica) en CNO (DREADDs) in hetzelfde dier.

Verfijning:

We hebben de mogelijkheid om ratten te trainen in hun thuishok. Hierdoor zijn de ratten minder gestrest, is de trainingstijd gereduceerd van drie maanden naar maximaal een maand en het aantal gemeten trials per sessie twee tot drie keer hoger als op de conventionele manier van trainen. De operatie en perfusie die de dieren zullen ondergaan wordt uitgevoerd onder diepe anesthesie. Ook zal er waar nodig analgesie gegeven worden om ongerief zoveel mogelijk te verminderen. Op de afdeling heeft het personeel veel ervaring met de operatie en met perfusies.

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijden adequate pijnstilling worden toegepast. Verder zullen alle operaties en perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie. Na een operatie worden de dieren 2 dagen extra gecontroleerd op gewicht en gezondheid en krijgen ze eventueel pijnbestrijding toegediend.

Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle GGO dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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 technieken die we gebruiken zijn dusdanig nieuw dat er nog maar een paar jaar mee gepubliceerd is, en voor zover wij weten heeft niemand nog iets over ons onderwerp geschreven. We staan bovendien in nauw contact met andere groepen in hetzelfde veld over de hele wereld, waarvan we ook weten dat ze niet met precies hetzelfde onderzoek bezig zijn. Wij achten de kans dat deze gedragsexperimenten al eerder zijn uitgevoerd vrijwel nihil.

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 dieren worden individueel gehuisvest, omdat ze in experiment 2, 3 en 4 kostbare en kwetsbare apparatuur geïmplantiseerd hebben gekregen. Uit ervaring is al gebleken dat de kans aanwezig is dat de implantaten kapot gaan als dieren samen gehuisvest zijn. Ook tijdens het trainen en testen in de CombiCage zullen de dieren individueel moeten worden gehuisvest. Dit omdat de CombiCage zodanig gemaakt is dat hij alleen individueel gehuisveste dieren aan kan. Maar de CombiCage betekent wel dat de dieren uiteindelijk weken tot maanden korter in de taak zullen zitten ten opzichte van de conventionele gedragstaak.

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.

Het dier wordt onder algehele verdoving gebracht tijdens de gehele operatie. De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t.

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.

De volgende humane eindpunten zullen worden gehanteerd:

- Verlies van lichaamsgewicht: >15% in 24 uur.
- Bewegingloosheid: als de rat na herstel van de operatie zich niet kan rondbewegen in zijn thuishok wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de rat voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Verliezen van implantaat (Wij schatten de kans hierop <5%)

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeldzaam.

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.

Handeling	Inschaling	Duur
Anesthesie	matig (allen)	1x voor 2-6 uur
Virusinjectie	matig (allen)	1 2-6 uur
Implantaat aanbrengen	matig (Calcium imaging, elektrofysiologie, optogenetics)	1x voor 2-6 uur
Individuele huisvesting	matig (allen)	2-7 maanden
Voedsel restrictie	matig (allen)	2-7 maanden
<i>i.p. of s.c.</i> injecties voor DREADD ligand CNO	licht (DREADDs)	<2 min per injectie, 1-3 weken

Aansluiten voor recordings	licht (Calcium imaging, elektrofysiologie, optogenetics)	dagelijks 2 min per dier voor 2-7 maanden
Perfusie onder verdoving	terminaal (allen)	15 minuten

Het cumulatief ongerief is 'matig' voor 100% van de dieren.

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.

Na experimenten is het essentieel om te controleren of je implantaat en virus expressie zich op de juiste plek bevond. Dit om de betrouwbaarheid van de experimenten hoog te houden. Hierdoor zullen we het brein uit de rat moeten halen en dit kan niet anders dan door de dieren te doden.

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.
- 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.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Muis fysiologische studies

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.

In deze experimenten willen we onderzoeken hoe verschillende inputs naar de mPFC de activiteit van individuele neuronen en verbindingen tussen neuronen beïnvloedt. Door gebruik van opsins of DREADDs is het mogelijk om inputs naar de mPFC te activeren of te remmen. Hierbij maken we gebruik van dieren die cre tot expressie brengen in bepaalde celtypen waardoor er door middel van virusinjecties zodat er specifieke modulatie mogelijk is van verschillende inputs. Daarnaast willen we gebruik maken van dieren die dmv genetische modificatie al opsins hebben. In deze dieren is er geen virusinjectie nodig waardoor het ongerief aanzienlijk minder is en er minder variabiliteit is die veroorzaakt kan worden door verschil in injectie hoeveelheid of locatie. Daarnaast willen we gebruik maken van verschillende muislijnen die fluorescente markers tot expressie brengen in specifieke celtypen zodat we deze kunnen identificeren.

In hersenplakjes kunnen we de activiteit van enkele neuronen meten. Door licht op de plakjes te schijnen kunnen we opsins activeren waardoor de activiteit van inputs gestimuleerd of geremd wordt. Hierbij kijken we naar de sterkte van connecties tussen neuronen, plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen.

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.

Muizen waarbij geen injecties plaatsvinden worden gedecapiteerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie. Dit wordt zonder anesthesie gedaan aangezien dit mogelijk invloed kan hebben op de fysiologische metingen.

De dieren zullen na een tot twee weken acclimatisatie eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfuseerd. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal 2 uur.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Alle dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen na anesthesie in een

stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt. Na 3-4 weken is er voldoende expressie van het virus en zal het dier worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie. De dieren blijven maximaal 8 weken na operatie staan.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken. Omdat er meerdere plakjes gemaakt kunnen worden in 1 dier is het mogelijk om meerdere metingen te doen in een dier. Echter omdat de connectiviteit in hersenplakjes erg afhankelijk is van de hoek waaronder het weefsel is gesneden is het aantal metingen per dier erg variabel. De hoeveelheid dieren zijn dan ook een maximaal aantal, en omdat er maar 1-2 dieren per dag gemeten kunnen worden per onderzoeker is het mogelijk dat als er genoeg cellen gemeten zijn het aantal dieren naar beneden bij te stellen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we muizen. Omdat er in dit onderdeel geen gedrag experimenten worden gedaan is het niet nodig om ratten te gebruiken. Muizen geven meer mogelijkheden vanwege de beschikbaarheid van verschillende lijnen met genetische modificaties, daarnaast zijn connecties zowel van en naar de mPFC als binnen de mPFC vergelijkbaar tussen deze diersoorten.

1. Modulatie van mPFC connectiviteit door acetylcholine:

Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in cholinerge neuronen, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt, door ervaring weten we dat er geen verschil is tussen beide geslachten. Wel kijken we altijd of resultaten verschillen tussen mannetjes en vrouwtjes. Met elektrofysiologische technieken in plakjes van de PFC kunnen we de connectiviteit tussen enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de afgifte van acetylcholine beïnvloeden. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van acetylcholine afgifte op connecties tussen cellen binnen dezelfde laag (4 groepen) als op connecties tussen lagen (10 groepen) met 4 verschillende opsins (14 connecties *4 opsins/DREADDs *10 n=560 dieren). Daarnaast willen we ook in wild-type dieren kijken hoe farmacologische activatie of remming van acetylcholine in hersenplakjes deze connecties beïnvloed ((14 connecties *2 farmaca *10 n=280 dieren)). In totaal zijn er dus 840 (560 + 280) dieren nodig voor deze experimenten.

2. Modulatie van mPFC plasticiteit door acetylcholine:

Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in cholinerge neuronen, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologische technieken in plakjes van de PFC kunnen we de activiteit van enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de afgifte van acetylcholine beïnvloeden. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van acetylcholine afgifte op plasticiteit in 5 verschillende neuron typen met 4 verschillende opsins (5 cel typen *4 opsins/DREADDs *10 n=200 dieren). Daarnaast willen we ook in wild-type dieren kijken hoe farmacologische activatie of remming van acetylcholine in hersenplakjes deze connecties beïnvloed (5 cel typen *2 farmaca *10 n=100 dieren). In totaal zijn er dus 300 (100 + 200)

dieren nodig voor deze experimenten.

3. Modulatie van mPFC connectiviteit vanuit andere hersengebieden:

Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in projectiegebieden naar de mPFC, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologische technieken in plakjes van de PFC kunnen we de connectiviteit tussen enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de inputs naar de PFC activeren. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van verschillende inputs naar de mPFC op connecties tussen cellen binnen dezelfde laag (4 groepen) als op connecties tussen lagen (10 groepen) vanuit 5 verschillende input gebieden. In totaal zijn er dus (14 connecties * 5 inputs * 10 n=700 dieren) nodig voor deze experimenten.

4. Modulatie van mPFC plasticiteit vanuit andere hersengebieden:

Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in projectiegebieden naar de mPFC, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologische technieken in plakjes van de PFC kunnen we de plasticiteit van neuronen meten en tegelijkertijd met licht de inputs naar de PFC activeren. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we onderzoeken hoe verschillende inputs naar de mPFC de activiteit van verschillende celtypen kan beïnvloeden. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Voor 5 verschillende input gebieden en 5 verschillende neuron typen hebben we in totaal (5 cel typen * 5 inputs * 10 n=250 dieren) dieren voor dit onderdeel nodig.

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:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.

Vermindering:

Omdat fysiologische experimenten veel tijd kosten worden de experimenten op een klein aantal dieren per keer gedaan. Hierdoor is het mogelijk dat de uiteindelijke hoeveelheid dieren lager uitvalt als er meer metingen per dier gedaan kunnen worden.

Verfijning:

We hebben getracht maximale verfijning te bereiken door deze experimenten in hersenplakjes uit te voeren en niet in levende dieren. Verder is het noodzakelijk om het virus te injecteren omdat dit de enige

mogelijkheid is om de activiteit op zo'n specifieke manier te manipuleren. Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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.

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. Er is weinig bekend over hoe acetylcholine connectiviteit beïnvloed. Er zijn publicaties over effecten van acetylcholine op plasticiteit, maar dit is voornamelijk gedaan dmv farmacologische modulatie en niet in alle celtypen die wij willen bestuderen.

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.

Alleen bij dieren waarbij geïnjecteed wordt is pijnverlichting noodzakelijk. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Dieren worden onder algehele anesthesie gehouden. De hoofdhuid wordt verdoofd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t.

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.

- Verlies van lichaamsgewicht: >15% in 24 uur.
- Bewegingloosheid: als de rat na herstel van de operatie zich niet kan rondbewegen in zijn thuishok wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de muis voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Handeling	Inschaling	Duur
Decapitatie	Licht	Enkele seconden
Virusinjectie	Matig	2 uur
Anesthesie	Matig	2 uur

Het cumulatieve ongerief is 'matig' voor dieren die virusinjecties krijgen (maximaal 80%), voor de andere dieren is dat licht (minimaal 20%).

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 onderzoek is gericht op fysiologische metingen in hersenplakjes. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk. Het is voor ons onderzoek van belang dat het weefsel in goede staat is, d.w.z. dat zoveel mogelijk neuronen in leven zijn en 'normale' activiteit vertonen. Anesthesie heeft een grote impact op neuronale activiteit en synaptische transmissie en interfereert daarom met de experimenten hier beschreven. Zo heeft anesthesie toxische effecten op het neuronale weefsel en is de plasticiteit, een essentieel van dit onderzoek, niet meer aanwezig bij isoflurane inhalatie (Simon et al., 2001) (Wei et al.,

2002) (Perouansky, 2007). Belangrijke systemen voor ons onderzoek die intact moeten zijn in het hersenweefsel, zijn het glutamaterge en het GABA-erge systeem in de hippocampus en neocortex. Anaesthetica grijpen op GABAA receptoren aan, alsmede op glutamaterge NMDA receptoren en andere ionkanaal receptoren. We passen koeling toe op het brein, direct na decapitatie waardoor binnen 30-60 seconden alle elektrische activiteit in het brein stopt.

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 rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie
3. Titel van de NTS:
De rol van de frontale cortex in aandacht en impulsiviteit
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *15-06-2017*
 - aanvraag compleet: *15-06-2017*
 - in vergadering besproken: *27-06-2017*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *28-06-2017 t/m 04-07-2017 en 20-07-2017 tot 09-08-2017*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *09-08-2017*
 - advies aan CCD: *16-8-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 - Datum advies IvD: *15-06-2017*
 - 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: *28-06-2017*
- Strekking gestelde vragen: *1. Bij de bijlagen moet de keuze voor het geslacht beter onderbouwd worden. 2. In de bijlagen geeft men goede onderbouwing van het onderscheid tussen ventrale en dorsale PFC. Deze onderbouwing graag ook toevoegen in het voorstel zelf. 3. Graag ziet de DEC meer onderbouwing voor de keuze van de verschillende diersoorten. 4. De DEC wil graag weten wat de effecten zijn van een korte isofluraanroes op de resultaten van het onderzoek.*
- Datum antwoord: *04-07-2017*

- Strekking van de antwoord(en): *1. Er is een referentie toegevoegd en uitgelicht over verschillen in performance in de 5CSRTT tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Ook is er een referentie toegevoegd over verschillen in stress na individueel huisvesten tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. 2. Dit is nu toegevoegd in sectie 3.4.1 van het voorstel. 3. De belangrijkste reden dat we muizen willen gebruiken is dat er meer mogelijkheden zijn voor genetische modificatie. Daarnaast zijn zowel de connecties van en naar de mPFC als binnen de mPFC vergelijkbaar tussen muizen en ratten. 4. In onderdeel L staat nu beschreven dat isofluraan negatieve effecten kan hebben op onze metingen.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

Vraagronde 2

- Datum: *20-07-2017*
- Strekking gestelde vragen: *1. De NTS moet op een aantal punten worden aangepast zodat het overeenkomt met de rest. 2. Enkele tekstuele opmerkingen bij het projectvoorstel en de bijlagen.*
- Datum antwoord: *09-08-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *1. De NTS is aangepast. 2. De opmerkingen zijn verwerkt.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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.*

3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Aandacht en concentratie zijn van groot belang om goed te functioneren in het dagelijks leven. Naast psychiatrische aandoeningen als aandachtstekortstoornis (ADD) en aandachtstekort-hyperactiviteitstoornis (ADHD) is aandacht vaak ook aangetast in andere, veel voorkomende ziektes zoals de ziekte van Alzheimer of depressie. We weten dat dieren en mensen slechter aandacht aan specifieke gebeurtenissen in hun omgeving kunnen besteden als de prefrontale cortex minder goed functioneert. De prefrontale cortex (PFC) in onze hersenen zorgt ervoor dat we onze aandacht kunnen vasthouden en relevante informatie uit onze omgeving kunnen filteren in een doelgerichte manier. Ook reguleert de PFC gedrag en emoties, voornamelijk door het inhiberen van ongepaste emoties, impulsen en gewoontes. Het is echter nog niet duidelijk hoe alle verschillende onderdelen met elkaar samenwerken, en welke inkomende en uitgaande informatie van belang is.

Het directe doel van dit project is inzicht verkrijgen in de rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Dit zal onderzocht worden door de rol van verschillende populaties projectieuronen in gedrag te onderzoeken en door het bestuderen van neuronen in hersenplakjes van ratten en muizen. De hypothese is dat verschillende neuronale populaties van de PFC betrokken zijn bij impuls-inhibitie of aandacht, afhankelijk van hun projectiegebied. Het uiteindelijke doel van de studie is om met deze kennis in de toekomst therapieën te ontwikkelen om achteruitgang in aandacht en impulsiviteit tegen te gaan. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De kennis van dit onderzoek kan in de toekomst bijdragen aan het ontwikkelen van betere behandelopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen (bv. bij ADD, ADHD, Alzheimer of depressie).

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: n.v.t

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te

realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn 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 kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw 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:

De locatie van de dierproef is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De dieren krijgen adequate verdoving 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.

Tijdens de experimenten 2, 3 en 4 van dierproef 2 worden de dieren individueel gehuisvest, omdat ze kostbare en kwetsbare apparatuur geïmplantiseerd hebben gekregen. Uit ervaring is gebleken dat de kans aanwezig is dat de implantaten kapot gaan als dieren samen gehuisvest zijn. Ook tijdens het trainen en testen in de CombiCage zullen de dieren individueel moeten worden gehuisvest, dit omdat deze kooi zo is gemaakt dat er alleen individueel gehuisveste dieren in kunnen worden gehouden. Deze CombiCage zorgt er wel voor dat de dieren in minder tijd (weken tot maanden) de gedragstaak kunnen voltooien.

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.

Het geschatte ongerief is maximaal matig voor 100% van de dieren. Matig ongerief ontstaat als gevolg van de virusinjectie, het aanbrengen van het implantaat, de individuele huisvesting en door voedselrestrictie. Licht ongerief ontstaat door DREADD injecties en het aansluiten van de dieren voor metingen van neuronale activiteit. Daarnaast zal de anesthesie licht tot matig

ongerief veroorzaken.

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 een implantaatoperatie ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zal een deel van de dieren individueel worden gehuisvest en is er sprake van voedselrestrictie.

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 de humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De volgende criteria zullen worden gebruikt: Verlies van lichaamsgewicht (> 15% in 24 uur), bewegingsloosheid en een abnormale houding. Daarnaast is het verliezen van het implantaat ook een eindpunt (de kans hierop is <5%). Gebaseerd op eerdere experimenten wordt er rekening gehouden met <3% uitval. Vóórdat meer dan matig ongerief optreedt zullen de humane eindpunten worden toegepast, het totale ongerief is dus maximaal matig.

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 proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Het is niet mogelijk de fundamentele kennis over de werking van de prefrontale cortex (PFC) te verkrijgen uit onderzoek met celkweek of de mens. De methodes zoals fMRI en PET hebben niet de resolutie om specifieke hersencellen of kleine groepen cellen bij een levend mens vast te leggen. Dit onderzoek is wel mogelijk bij ratten en muizen, omdat men daar wel alle hersengebieden en cellen kan bereiken.

De keuze voor het gebruik van ratten en muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Ratten zijn beter geschikt voor complex gedragsonderzoek, omdat ze het vermogen hebben om aandachtstaken binnen afzienbare tijd te leren en omdat het rattenbrein grote overeenkomsten heeft met dat van mensen. Muizen zullen gebruikt worden voor experimenten waarbij bepaalde typen cellen worden geactiveerd of geremd. Muizen geven meer mogelijkheden vanwege de beschikbaarheid van verschillende lijnen met genetische modificaties.

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 het gefaseerd uitvoeren van de experimenten wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Door de nieuwste technieken te gebruiken is het daarnaast mogelijk meer informatie te verwerven zonder dat er meer proefdieren nodig zijn.

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 1780 ratten en 2090 muizen 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.

De onderzoekers hebben getracht maximale verfijning te bereiken door de experimenten met muizen in hersenplakjes in plaats van in levende dieren uit te voeren. De ratten worden getraind in hun thuishok, waardoor de trainingstijd wordt gereduceerd en het stresslevel daalt. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. Vóórdat meer dan matig ongerief optreedt zullen de humane eindpunten worden toegepast en de dieren worden gedood, zodat het maximale ongerief matig is.

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.

Voor de experimenten met muizen zal men zowel mannetjes als vrouwtjes gebruiken.

Echter voor de experimenten met ratten willen de onderzoekers graag alleen mannetjes gebruiken om de volgende redenen: 1. Omdat de gemeten parameters onder invloed kunnen zijn van oestrogenen willen we voorkomen dat de oestrogeencyclus van vrouwen invloed heeft op onze resultaten. 2. De gemeten parameters in de 5CSRTT verschillen voor mannetjes en vrouwtjesratten (Jentsch et al., 2003). 3. Gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten is niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de hanteerbaarheid van de mannelijke ratten. 4. Daarnaast is uit de literatuur bekend dat individuele huisvesting voor vrouwelijke dieren stressvoller is dan voor mannelijke dieren. Gebaseerd op deze resultaten heeft het dus voorkeur om uitsluitend mannelijke ratten te gebruiken vanwege de individuele huisvesting. De DEC is van mening dat het gebruik van één geslacht hiermee goed is verantwoord.

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 de experimenten in ratten is het essentieel om te controleren of het implantaat en de virus expressie zich op de juiste plek bevonden, dit kan alleen door het brein te onderzoeken, en daarom is het noodzakelijk de dieren te doden. Het onderzoek in muizen is gericht op fysiologische metingen in hersenplakjes, doding van het dier door decapitatie zonder voorafgaande anesthesie is hiervoor noodzakelijk. 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 rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie het gebruik van maximaal 1780 ratten en 2090 muizen die daarvan 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 maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling mb.t. de prefrontale cortex. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk voordeel op de lange termijn wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van betere behandelingsopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen.

De DEC is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 1780 ratten en 2090 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over de functie van de prefrontale cortex is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment 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 kennis verkrijgen over de rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van meer kennis en mogelijk betere behandelopties, is afgewogen tegen het, 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 1780 ratten en 2090 muizen, 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. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van meer kennis over de rol van de prefrontale cortex bij aandacht en impuls-inhibitie.

(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 van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 1780 ratten en 2090 muizen en het daarbij verwachte 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).

Een van de DEC leden heeft bezwaren geuit tegen het onverdoofd decapiteren van de muizen ten behoeve van het fysiologisch onderzoek. Naar zijn mening zijn de gepresenteerde argumenten dat een korte isofluraanroes de resultaten van de metingen zou beïnvloeden onvoldoende overtuigend. Het ongerief (stress) gepaard gaande met een lichte isofluraanroes is naar inschatting vergelijkbaar met de stress en de kortdurende pijn van decapiteren van het hoofd zonder voorafgaande anesthesie. Het decapiteren zonder verdoving heeft echter het inherente risico dat een dier zich onverwacht

verzet precies op het moment dat het guillotinemes wordt gesloten met kans op ernstig ongerief. Het hebben van veel ervaring van het personeel met het toepassen deze methode biedt een zekere garantie dat een dergelijke situatie zich niet zal voordoen. Echter de kans is zeker niet nul en in de leerfase om de benodigde ervaring te verkrijgen is de kans hoger.

Omdat hij van de wetenschappelijke noodzaak voor doden zonder anesthesie onvoldoende overtuigd is, is dit lid van de DEC daarom van mening dat kortdurend isofluraan gebruikt moet worden om de (kleine) kans op ernstig ongerief te voorkomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

[Redacted]

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
AVD1120020173124

Bijlagen

2

Datum 23 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 augustus 2017. Het gaat om uw project "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1120020173124. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

23 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1120020173124

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

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
IBAN: NL66ABNA0500302480
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: VU Amsterdam

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: Van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM
Wat mag de gemachtigde doen?
 Een projectvergunning aanvragen
 Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
 Alle bovenstaande opties

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 rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie
Titel niet-technische samenvatting: De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Datum:

23 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1120020173124

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: )
Plaats: Amsterdam
Datum: 23 augustus 2017



> 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
AVD1120020173124

Bijlagen

2

Datum 23 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 augustus 2017

Vervaldatum: 22 september 2017

Factuurnummer: 173124

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1120020173124	€ 1.541,00

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: maandag 18 september 2017 14:50
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD1120020173124: 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: "antwoorden CCD_AVD1120020173124.pdf" en " NTS_prefrontale cortex_final_v2 (14-9).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,



[REDACTED] | WERKDAGEN: **ma – do (vr)** |
POSTADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam |
BEZOEKADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam | [Disclaimer](#)

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: woensdag 13 september 2017 11:06
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: AVD1120020173124: aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED]

Op 23 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1120020173124. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- Er vindt in bijlage 3.4.4.2. deprivatie van voedsel plaats om de dieren te motiveren voor de '5-choice serial reaction time task'. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor voedseldeprivatie 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). Ook zijn de mate en duur van de deprivatie en de effecten daarvan op de dieren niet beschreven. U wordt verzocht dit te beschrijven. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

- In bijlage 3.4.4.3 worden dieren gedood middels decapitatie. Deze methode mag alleen toegepast worden als andere methodes niet mogelijk zijn. U geeft aan dat het toepassen van anesthesie een grote impact heeft op neuronale activiteiten en interfereert met de experimenten beschreven in de aanvraag. Uit het DEC advies blijkt dat een van de DEC leden is van mening is dat de gepresenteerde argumenten niet toereikend zijn, dat het ongerief veroorzaakt door een lichte isofluraanroes naar schatting vergelijkbaar is met de stress en kortdurende pijn van decapitatie, en dat er bij decapitatie zonder verdoving de kans bestaat dat de dieren ernstig ongerief

ondergaan op het moment dat een dier zich verzet als het guillotines wordt gesloten. Het desbetreffende DEC lid is daarom van mening dat decapitatie zonder voorafgaande verdoving niet toegestaan zou moeten worden. U wordt verzocht te reageren op het advies van de DEC op dit punt.

- Hoewel u aangeeft dat anesthesie niet mogelijk is, beschrijft u niet waarom cervicale dislocatie niet mogelijk is. U wordt verzocht dit onderbouwen.

- U wordt verzocht het ongerief in de NTS in overeenstemming te brengen met het ongerief in de aanvraag. Niet alle dieren ondergaan matig ongerief.

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. 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

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo

Verzonden: woensdag 23 augustus 2017 13:21

Aan: Dessens, D. (d.dessens@vu.nl)

CC: 't.s.heistek@vu.nl'

Onderwerp: OntvangstBevestiging 3124

Geachte [REDACTED],

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

,
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Antwoorden van de onderzoekers op de vragen van de CCD bij aanvraagnummer AVD1120020173124

- Er vindt in bijlage 3.4.4.2. deprivatie van voedsel plaats om de dieren te motiveren voor de '5-choice serial reaction time task'. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor voedseldeprivatie 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). Ook zijn de mate en duur van de deprivatie en de effecten daarvan op de dieren niet beschreven. U wordt verzocht dit te beschrijven. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

Een standaard methode om proefdieren gemotiveerd te krijgen een doelgerichte taak te laten doen is voedseldeprivatie. Hierbij worden de ratten tot ~85% van hun normale lichaamsgewicht gedepriveerd door ze dagelijks toegang tot een beperkte hoeveelheid voedsel te geven. Dit in tegenstelling tot vrije toegang tot voedsel, waarbij de ratten zoveel kunnen eten als ze willen.

De 5-choice serial reaction time task is een taak die gebaseerd is op doelgericht gedrag van de rat. Om goede wetenschappelijke conclusies op basis van het gedrag van de rat te kunnen trekken moet de rat de taak goed uitvoeren; hij doet genoeg herhalingen van de taak op een goed prestatieniveau. Tijdens het doen van de taak zien wij ook heel duidelijk een verband tussen de hoeveelheid voedselrestrictie en goed de rat te taak doet. Ratten die niet of nauwelijks gewicht zijn afgevallen doen de taak slecht, maar wanneer ze een paar dagen minder voedsel hebben gekregen zien we een grote verbetering in de prestatie in de taak. De ratten krijgen ongeveer, afhankelijk van de duur van het experiment, tussen de 1 en 2 maanden beperkt toegang tot voer. De totale hoeveelheid voer per dag blijft relatief constant en bestaat uit een combinatie van voer verdiend in het experiment as wel extra toegediend voer.

Het geven van voedsel in de gedragstaak is een positieve beloning. Wanneer een rat vrij toegang heeft tot voedsel is de beloning per verdiende voedsel pellet in de taak lager dan wanneer er voedseldeprivatie plaats vindt.

Ook is in de literatuur beschreven dat vrije toegang tot voedsel voor ratten kan leiden tot ziekteverschijnselen zoals diabetes en kanker. In ratten die beperkte toegang hebben tot voedsel zien we deze ziektebeelden aanzienlijk minder en kunnen als gezondere beesten beschouwd worden.

De ratten behouden vrij toegang tot water.

- In bijlage 3.4.4.3 worden dieren gedood middels decapitatie. Deze methode mag alleen toegepast worden als andere methodes niet mogelijk zijn. U geeft aan dat het toepassen van anesthesie een grote impact heeft op neuronale activiteiten en interfereert met de experimenten beschreven in de aanvraag. Uit het DEC advies blijkt dat een van de DEC leden is van mening is dat de gepresenteerde argumenten niet toereikend zijn, dat het ongerief veroorzaakt door een lichte isofluraanroes naar schatting vergelijkbaar is met de stress en kortdurende pijn van decapitatie, en dat er bij decapitatie zonder verdoving de kans bestaat dat

de dieren ernstig ongerief ondergaan op het moment dat een dier zich verzet als het guillotinemes wordt gesloten. Het desbetreffende DEC lid is daarom van mening dat decapitatie zonder voorafgaande verdoving niet toegestaan zou moeten worden. U wordt verzocht te reageren op het advies van de DEC op dit punt.

In ons lab wordt decapitatie zonder verdoving al jaren toegepast. Hier is het nog nooit voorgekomen dat een dier extra ongerief heeft gehad. Als het dier goed gefixeerd is dan is het niet mogelijk dat het dier zich terugtrekt op moment van decapitatie. Aangezien het ongerief vergelijkbaar is met isofluraan roes en isofluraan mogelijk invloed heeft op de metingen zijn wij van mening dat decapitatie de beste methode is.

- Hoewel u aangeeft dat anesthesie niet mogelijk is, beschrijft u niet waarom cervicale dislocatie niet mogelijk is. U wordt verzocht dit onderbouwen.

Bij het vrij prepareren van het brein is het belangrijk dat dit zo snel mogelijk gebeurt, aangezien het weefsel in leven moet blijven. Cervicale dislocatie is een extra handeling waardoor het langer duurt aangezien het dier daarna alsnog gedecapiteerd moet worden. Daarnaast is er de mogelijkheid dat cervicale dislocatie mechanische schade aanbrengt aan het brein. Er is ook een mogelijkheid dat de cervicale dislocatie niet afdoende wordt uitgevoerd en het dier extra ongerief heeft.

- U wordt verzocht het ongerief in de NTS in overeenstemming te brengen met het ongerief in de aanvraag. Niet alle dieren ondergaan matig ongerief.

Het ongerief in de NTS is aangepast



> 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
AVD1120020173124
Bijlagen

1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" met aanvraagnummer AVD1120020173124. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 13 september 2017 hebben wij u vragen gesteld over deprivatie, decapitatie en NTS. 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 rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" 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 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:
19 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Comm

namens de

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 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 rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" met aanvraagnummer AVD1120020173124, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 september 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 23 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Rat anatomische en fysiologische studies				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	500	100% Matig	
3.4.4.2. Rat gedrag				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.280	100% Matig	
3.4.4.3. Muis fysiologische studies				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.090	80% Matig 20% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD1120020173124

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



Aanvraagnummer:

AVD1120020173124

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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

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.