



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 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 [Redacted]
		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 Boelelaan 1105
		Postbus -
		Postcode en plaats 1081HV Amsterdam
		IBAN [Redacted]
		Tenaamstelling van het rekeningnummer [Redacted]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie [Redacted]
		Afdeling [Redacted]
		Telefoonnummer [Redacted]
		E-mailadres [Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie [Redacted]
		Afdeling [Redacted]
		Telefoonnummer [Redacted]
		E-mailadres [Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 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 |
| <input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- | |
|--|
| <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 *melding* voor een project of dierproef waar 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 |

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| Mechanismen van neuropeptideafgifte en -transport |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-VU-VUMC |
| Postadres | [REDACTED] Amsterdam The Netherlands |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,- Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Amsterdam
Datum	16-01-2017
Handtekening	[REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Naast de snelle afgifte van neurotransmitters communiceren hersencellen met elkaar via de afgifte van met neuropeptiden gevulde blaasjes ('vesicles'). Neuropeptiden hebben een langdurig effect op de hersenen en oefenen hiermee een sterke invloed uit op processen als gedrag, gevoel en ontwikkeling. Er zijn meer dan 70 verschillende neuropeptiden bekend met een robuust effect op de functie van het brein: Ze reguleren voedselinname en slaapritme, sturen leer- en geheugenprocessen, en zijn essentieel voor een juiste ontwikkeling van de hersenen. Defecten in neuropeptide afgifte leiden tot neurologische en psychische aandoeningen als epilepsie, autisme, schizofrenie en depressie. Het neuropeptide oxytocine geeft deze sterke invloed goed weer. Dit neuropeptide is betrokken bij de onderdrukking van angst en controleert sociale 'bonding' (Knobloch et al., 2012). Oxytocine wordt daarom aangedragen als veelbelovende behandelingsmethode van stoornissen die zich kenmerken door abnormale sociale interactie, zoals schizofrenie (Millan et al., 2014), borderline persoonlijkheidsstoornissen, autisme (Meyer-Lindenberg et al., 2011), depressie (MacDonald et al., 2013) en angststoornissen (Guastella et al., 2009). Neuropeptide Y (NPY) laat een vergelijkbare geschiedenis zien: dit neuropeptide is een belangrijke potentiële kandidaat bij de behandeling van Post Traumatic Stress Disorder (PTSD, Sah et al 2013, Cohen et al. 2012). Deze voorbeelden laten het overduidelijke belang van neuropeptiden zoals oxytocine en NPY voor ons gedrag zien. Maar ondanks de fundamentele zijn de mechanismen die de afgifte van deze stoffen in het brein controleren vrijwel onbekend en is het effect van neuropeptiden afgifte op de doelcellen niet goed uitgezocht.

Het gebrek aan inzicht in de mechanismen van neuropeptidenafgifte en het effect van neuropeptiden op de doelcellen is een groot probleem bij de ontwikkeling van nieuwe en betere behandelingsmethoden voor de vele hersenaandoeningen waarbij neuropeptiden een rol spelen. Het is daarom van essentieel belang om de onderliggende moleculaire processen tot in detail te begrijpen. Alleen dan kunnen we tot betere therapieën komen die de ziekteprocessen kunnen stoppen. Gezien de aard van de aandoeningen waaraan het disfunctioneren van het neuropeptide systeem ten grondslag ligt en het grote aantal mensen die deze aandoeningen heeft achten wij het verantwoord om deze aandoeningen in dieren te onderzoeken.

[REDACTED]. Tevens maken de neuronen in celculturen geen contact met de correcte doelcellen. Daardoor kunnen de effecten van neuropeptideafgifte op doelcellen niet worden onderzocht in celculturen Het is daarom van essentieel belang dat naast de cellulaire studies de mechanismen van neuropeptideafgifte en het effect van deze afgifte op doelcellen in het intacte brein en in specifieke hersengebieden wordt onderzocht. Alleen in het intacte brein en in hersenplakjes is de natuurlijke omgeving intact en projecteren neuronen naar de juiste doelcellen zodat de correlatie tussen afgifte van neuropeptiden en effecten op de doelcellen kan worden bestudeert en getest kan worden of de afgifte principes [REDACTED]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Ondanks het overduidelijke belang van neuropeptiden voor hersenfunctie is er helaas op dit moment weinig tot geen kennis over de mechanismen waarmee de met neuropeptiden gevulde blaasjes worden getransporteerd en afgegeven in het brein. Daarnaast is het effect van neuropeptide afgifte op de exciteerbaarheid van de doelcellen voor de meeste neuropeptiden onbekend. Het hoofddoel van deze studie daarom is om de mechanismen

van neuropeptideafgifte te leren begrijpen, en richt zich hiervoor op de *moleculaire* mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de *effecten* van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit.

Aan de hand van deze onderwerpen zijn de volgende onderzoeksvragen opgesteld:

(1) Wat zijn de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte in het brein?

In de hersencellen worden neuropeptiden getransporteerd in lipide-blaasjes die met de celmembraan kunnen fuseren en zo hun inhoud loslaten om signalen af te geven naar andere cellen. Voor een effectieve werking van neuropeptiden is het essentieel dat de fusie van neuropeptideblaasjes met de celmembraan sterk wordt gereguleerd en dat de blaasjes in de buurt van synapsen fuseren om zo de afgifte van neurotransmitters efficiënt te kunnen beïnvloeden. [REDACTED]

[REDACTED] Echter, dit *in vitro* systeem heeft belangrijke beperkingen: zo maken de neuronen synapsen op willekeurige omliggende neuronen en zijn de calcium niveaus (veel) hoger dan in het intacte brein. Welke eiwitten essentieel zijn voor de afgifte van neuropeptideblaasjes in de buurt van synapsen in het intacte brein en welke eiwitten belangrijk zijn bij de calciumafhankelijke afgifte is daarom volledig onbekend. [REDACTED]

[REDACTED] Het doel is om tot een volledige beschrijving te komen van het fusie mechanisme van neuropeptiden in het brein. Omdat neuropeptiden een sterk effect hebben op zowel hersenontwikkeling als hersenfunctie in volwassen organismen, onderzoeken we of de mechanismen van afgifte tijdens de ontwikkeling en in volwassen dieren overeenkomen.

(2) Wat is de relatie tussen neuropeptideafgifte en de communicatie van hersennetwerken: het neuropeptide oxytocine als modelsysteem

Neuropeptiden reguleren de activiteit van hersencellen. Het is helaas niet bekend hoe neuropeptiden worden afgegeven en hoeveel met neuropeptiden gevulde blaasjes nodig zijn om een effect te hebben op de doelcellen. [REDACTED]

[REDACTED] We gebruiken voor deze studies het neuropeptide oxytocine als model systeem, omdat het oxytocine systeem goed beschreven is door onze collega's (Knobloch et al., 2012), oxytocine een sterk effect heeft op hersenactiviteit en geassocieerd is met hersenaandoeningen waaronder het Prader Willi syndroom (PWS). PWS is een genetisch defect waarbij patiënten, naast eetstoornissen, cognitieve en sociale problemen hebben. Het neuropeptide oxytocine speelt een belangrijke rol in dit syndroom. PWS patiënten hebben verlaagde oxytocineniveaus in het brein, waarschijnlijk door een probleem bij de synthese en afgifte van dit neuropeptide. Toediening van oxytocine aan PWS patiënten laat een sterke verbetering zien van de symptomen en lijkt daarmee een veelbelovende vorm van therapie. We begrijpen alleen het mechanisme van dit effect nog niet. We testen de hypothese dat oxytocine de connecties van oxytocine axonen met hun doelgebieden herstelt en/of de afgifte van oxytocineblaasjes bevordert. Dit onderzoeken we door fluorescent gelabeld oxytocine samen met een axonmarker tot expressie te brengen in muizen en ratten, en vervolgens deze processen te bestuderen in het intacte brein en in hersenplakjes. Omdat oxytocine een belangrijke rol speelt tijdens zowel de ontwikkeling van de hersenen als in het volwassen brein, testen we de effecten van oxytocineafgifte in hersenplakken van jonge pasgeboren dieren en volwassen dieren. Samen met de kennis opgedaan in onderzoeksvraag 1 kunnen we gerichte therapieën voorstellen om oxytocine signaaloverdracht te verbeteren in PWS patiënten. Defecten in oxytocine signalering liggen ook ten grondslag aan post-traumatische stress (PTSD) en autisme spectrum disorders (ASD). De door ons verkregen inzichten in de moleculaire mechanismen die hieraan ten grondslag liggen vormen de basis voor meer gerichte aanpak van deze aandoeningen.

Haalbaarheid:

Het doel is om de bovenstaande onderzoeksvragen over een periode van 5 jaar te beantwoorden. Deze schatting is gebaseerd op onze jarenlange ervaring met het verloop en de duur van vergelijkbare onderzoeksprojecten. De expertise, technische ondersteuning, funding en mankracht om dit project binnen deze tijd te kunnen afronden is aanwezig bij de vakgroep (40 FTE research staff, 10 FTE

ondersteunend personeel).

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang. Dit project is belangrijk omdat neuropeptiden betrokken zijn bij neurologische en psychiatrische processen met enorme maatschappelijke impact, zoals angst- en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht, epilepsie en pijnervaring. Tot op heden is de behandeling van deze aandoeningen vaak enkel symptomatisch om tot een meer succesvolle interventie te komen is fundamenteel inzicht in neuropeptide afgifte en het effect van deze afgifte noodzakelijk.

In een recent review in het toonaangevende blad Science (Young et al. 2015) wordt gesteld dat het gebrek aan mechanistisch inzicht in de afgifte van het neuropeptide oxytocine een succesvolle therapie in de weg staat. Hoewel toediening van oxytocine wordt aangedragen als veelbelovende behandelingsmethode van stoornissen die zich kenmerken door een abnormale sociale interactie, zoals schizofrenie (Millan et al. 2014), borderline persoonlijkheidsstoornissen, autisme (Meyer-Lindenberg et al. 2011), depressie (MacDonald et al. 2013, Mah et al. 2013) en angststoornissen (Guastella et al. 2009) en dus in potentie een enorme impact kan hebben op het welzijn van miljoenen mensen. Staat het gebrek aan kennis van de onderliggende mechanismen verdere ontwikkeling van therapieën in de weg. Ons onderzoek kan hierdoor bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de hierboven genoemde aandoeningen en zo ernstig ongerief bij mensen helpen verminderen.

De lijst met voorbeelden van neuropeptiden gerelateerd aan neurologische aandoeningen is lang. Neuropeptide Y (NPY) is een belangrijke potentiële kandidaat bij de behandeling van Post Traumatic Stress Disorder (PTSD, Sah et al 2013, Nulk et al. 2011). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is een belangrijke regulator van neurotransmissie en connectiviteit. Dit neuropeptide staat sterk in de belangstelling als mogelijke behandeling voor neurodegeneratieve aandoeningen zoals Alzheimer 's, Parkinsonisme en Huntington (Nagahara and Tuszynski, 2011).

Dus, omdat onze onderzoeksmethoden het gedrag bestuderen van alle neuropeptide vesicles beperkt het belang zich niet tot het neuropeptide oxytocine dat wij als model systeem gebruiken maar bestrijkt het het hele veld van aan neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen.

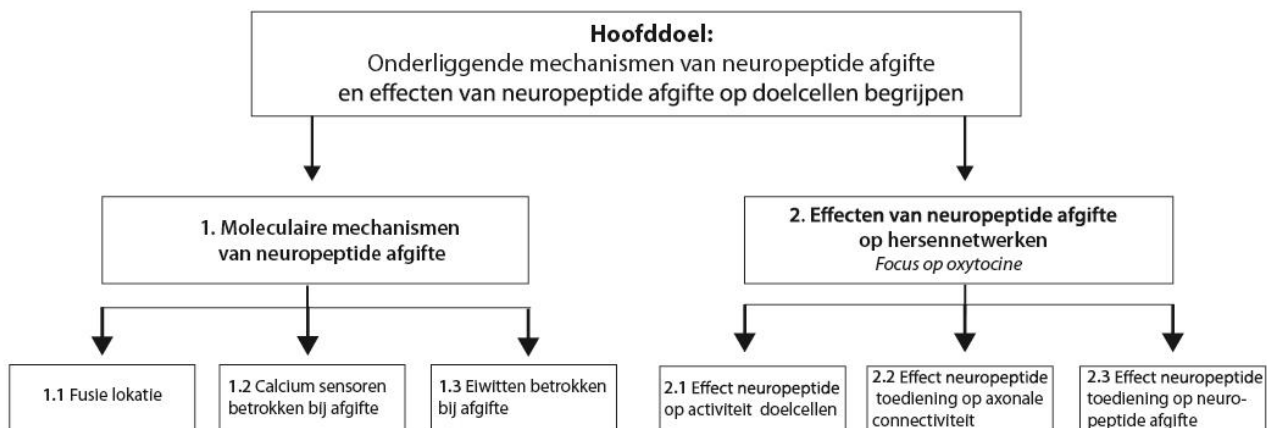
Wetenschappelijk belang. De gereguleerde afgifte van signaal moleculen is essentieel voor het functioneren van ons brein. In tegenstelling tot de uitgebreid beschreven mechanismen die de fusie van met neurotransmitter geladen blaasjes reguleren (Nobel prijs 2012) weten we nog weinig van de fusie mechanismen van neuropeptideblaasjes. Deze studie zal wetenschappelijk inzicht verschaffen in de mechanismen van neuropeptideafgifte. Ons doel is om tot hetzelfde hoge niveau van begrip te komen als verkregen is voor synaptische blaasjes. Daarnaast zal deze studie de wetenschappelijke kennis over de effecten van de afgifte van neuropeptiden op hersenactiviteit vergroten. Hiermee zal dit onderzoek fundamentele kennis leveren die nodig is voor het begrijpen van de afgifte en regulatie van de afgifte van neuropeptiden, zoals NPY en oxytocine en leiden tot belangrijke wetenschappelijke voortgang in onderzoek naar de onderliggende mechanismen van neuropeptide-dysfunctie in hersenaandoeningen.

[Redacted text]

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het hoofddoel van deze studie is om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de effecten van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit te begrijpen. De twee onderzoeksvragen worden opgedeeld in drie subvragen. De proefopzet van dit project is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Algemene opzet van het project.

(1) Wat zijn de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte in het brein?

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden zullen neuropeptideblaasjes worden gelabeld met fluorescente neuropeptiden (zie 3.4.2) en zullen de volgende subvragen worden beantwoord:

1.1 Wat is de subcellulaire locatie van neuropeptideafgifte in intacte hersengebieden?

[Redacted text] Hier testen we of dit in intacte embryonale en volwassen hersengebieden ook zo is en of dezelfde principes gelden voor verschillende neuropeptiden.

1.2 Welke calciumsensoren zijn betrokken bij afgifte van neuropeptiden in intacte hersengebieden?

[Redacted text] Hier testen we deze hypothese.

1.3 Wat is de rol van zogenaamde priming-eiwitten zoals [Redacted text]

[Redacted text] Hier testen we of in intacte hersengebieden deletie van deze eiwitten een effect heeft op de afgifte van neuropeptiden.

Model: hersenplakjes waarbij neuropeptiden en synapsen gelabeld zijn door middel van *in utero* elektroporatie (IUE) van muizenembryo's voor analyse in embryonale hersenen, en virale injecties van jong volwassen muizen voor analyse in volwassen hersenen. Stimulatie door middel van elektrische veldstimulatie en/of optogenetica. Subvraag 1.1 zal uiteindelijk ook getest worden *in vivo*.

Uitleesparameter: fusie van individuele neuropeptideblaasjes na stimulatie. Analyse synaptische en extrasynaptische afgifte via live labeling van synapsen.

(2) Wat zijn de effecten van neuropeptideafgifte op de communicatie van hersennetwerken het neuropeptide oxytocine als modelsysteem

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden zullen, in de hersenen van ratten, oxytocineblaasjes worden gelabeld met fluorescent oxytocine (zie 3.4.2). Ratten worden voor oxytocine-experimenten ingezet vanwege hun grote aantal oxytonerge neuronen. Hiermee zullen de volgende subvragen worden beantwoord:

2.1 wat is de correlatie tussen oxytocineafgifte en modulatie van de doelneuronen?

Hier testen we in hersenplakjes de correlatie tussen afgifte van fluorescent gelabelde oxytocineblaasjes en activiteit van de doelcellen door middel van elektrische stimulatie van afgifte en elektrofysiologische metingen aan de doelcellen.

2.2 wat is het effect van oxytocinetoediening op de axonale connectiviteit van oxytocine-neuronen?

Oxytocine zal worden toegediend aan hersenplakjes en de axonale connectiviteit zal worden bestudeerd met microscopische technieken. Voor *in vivo* metingen van axonale connectiviteit zal fluorescent oxytocine samen met een axonale marker tot expressie worden gebracht in volwassen muizen

2.3 wat is het effect van oxytocinetoediening op het transport en afgifte van oxytocineblaasjes?

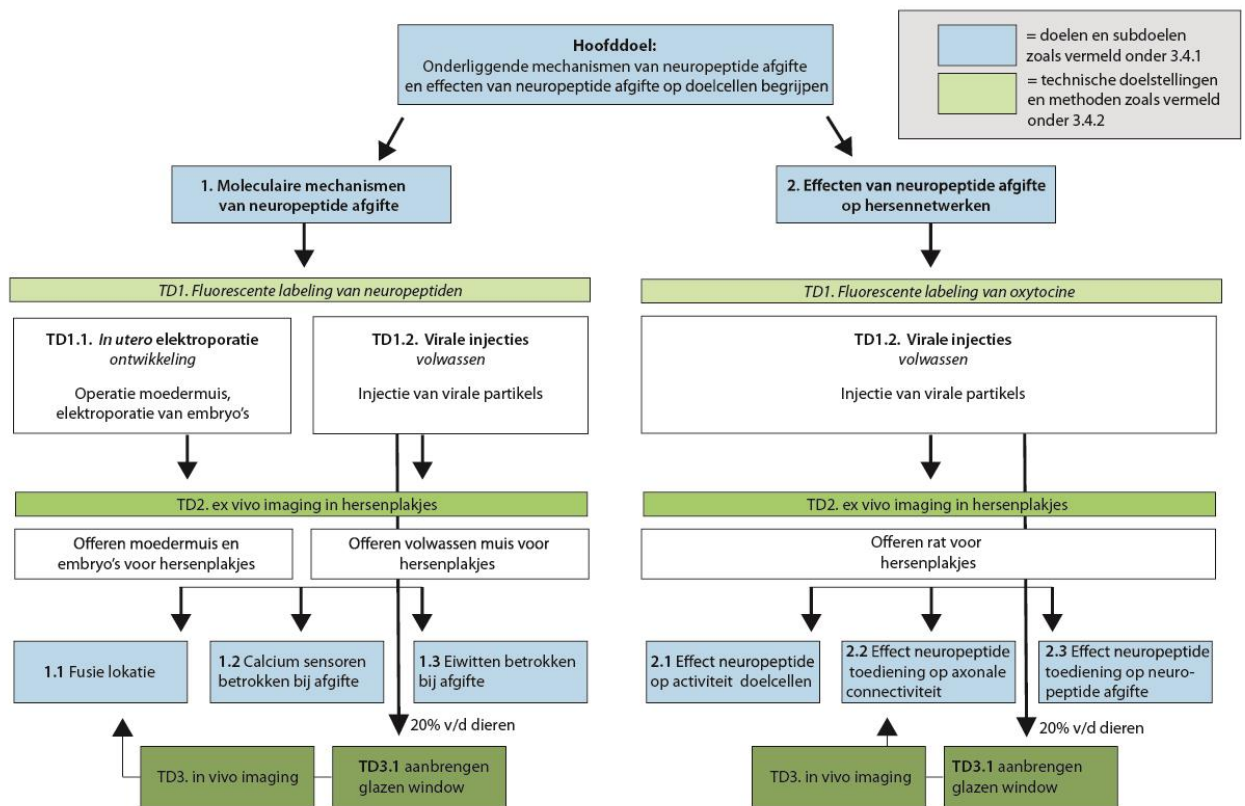
Oxytocine zal worden toegediend aan hersenplakjes van ratten en het transport en de afgifte zal worden bestudeerd met microscopische technieken. Netwerkactiviteit en het effect van oxytocine zal worden gemeten met behulp van elektrofysiologische metingen.

Model: hersenplakjes waarbij het neuropeptide oxytocine en synapsen gelabeld zijn door middel van virale injecties van jong volwassen ratten voor analyse in volwassen hersenplakjes. Stimulatie door middel van elektrische veldstimulatie en/of optogenetica.

Uitleesparameter: fusie van individuele neuropeptideblaasjes na stimulatie. Analyse effect op doelcellen door middel van elektrofysiologie.

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

In de komende alinea's zal worden beschreven welke dierproef ingezet zal worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen (3.4.1). Om de onderzoeksvragen te beantwoorden, zullen neuropeptiden fluorescent gelabeld moeten worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van: (1) *In utero* elektroporatie (IUE), of (2) virale injecties (zie *figuur 2*).



Figuur 2. Dit figuur geeft de logische samenhang weer van de methoden (technische doelen, TD, groene onderdelen) die uitgevoerd zullen worden om de hiervoor beschreven doelen en subdoelen te bereiken (blauwe onderdelen), zoals vermeld bij onderdeel 3.4.1.

Rationale:

- IUE zal alleen in muizen toegepast worden, en vanwege het gebruik van ratten voor onderzoeksvraag twee, alleen voor onderzoeksvraag 1 worden gebruikt.
- IUE kan niet worden gecombineerd met het plaatsen van een glazen window, vandaar dat alleen virale injecties kunnen worden opgevolgd door een *in-vivo* imaging studie.
- De leeftijden van de dieren dit in deze studie worden ingezet, variëren van prenataal (IUE) en ouder dan 2 weken (virale injecties). Dit heeft te maken met de leeftijd waarop dieren geïnjecteerd kunnen worden voor beide methoden.

TD, Technisch doel

Voor beide onderzoeksvragen zijn twee technische doelen (TD) van belang:

TD 1. Labeling van neuropeptideblaasjes door middel van de expressie van fluorescente neuropeptiden

Om de hierboven beschreven mechanismen en effecten van neuropeptideafgifte te bestuderen, worden neuropeptideblaasjes in muizen en ratten zichtbaar gemaakt door fluorescent gelabelde neuropeptiden tot expressie te brengen. [redacted]. We gebruiken twee complementaire strategieën: (1) *in utero* elektroporatie (IUE, Appendix 1) en (2) virale injecties in de hersenen (Appendix 2).

TD 1.1 In utero elektroporatie (IUE) van muizen voor imaging in hersenplakjes

IUE is essentieel om de effecten van neuropeptideafgifte te bestuderen tijdens de ontwikkeling van de hersenen (zie Appendix 1). [redacted]

Tijdens de zwangerschap zal de moedermuis een operatie ondergaan onder anesthesie en adequate pijnstilling, waarbij de uterus uit het abdomen wordt gehaald en de foetussen geëlektroporeerd worden met DNA constructen om neuropeptideblaasjes (NPY, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) of oxytocine), synaptische contacten (synapsin) en axonale projecties fluorescent te labelen. De moedermuis zal peri-operative pijnstillers ontvangen. De foetussen zullen uit de moeder worden gehaald voor de geboorte, waarbij de moedermuis zal worden geofferd door middel van cervicale dislocatie. De hersenen van de *in utero* geëlektroporeerde dieren zullen worden gebruikt voor de bereiding van hersenplakken (zie TD2 hieronder).

TD 1.2 Virale injectie in volwassen muizen en ratten voor imaging in hersenplakjes en in vivo imaging

Virale injecties worden gebruikt om neuropeptideblaasjes te labelen in specifieke hersenregio's van volwassen muizen en ratten. Virale injecties worden toegepast op jong volwassen dieren vanwege de beschikbare Bregma coördinaten (zie Appendix 2). Het injecteren bestaat uit een operatie onder volledige narcose waarbij de vacht wordt weggeschoren en de schedel via een incisie wordt blootgelegd. De locatie van injectie kan nauwkeuring bepaald worden aan de hand van Bregma coördinaten. Uit experimenten van onze collega Prof. Dr. Valery Grinevich in Heidelberg is gebleken dat virale expressie van oxytocine binnen 2 weken na injectie zichtbaar is (Knobloch et al., 2011). De hersenen van de geïnjecteerde muizen en/of ratten zullen worden gebruikt om neuropeptideafgifte in hersenplakken van volwassen dieren te bestuderen.

TD 2. Ex vivo imaging methoden

TD 2.1 Hersenplakjes voor ex vivo live cell imaging

Voor het bereiden van hersenplakjes zal het dier geofferd worden, waarna de hersenen worden verwijderd voor analyse. Voor studies naar het mechanisme van neuropeptideafgifte en het effect van oxytocine in embryonale hersenen zal de zwangere moedermuis geofferd worden door middel van cervicale dislocatie en de pups geofferd worden door decapitatie, waarna hersenplakken bereid worden. Voor studies in hersenplakjes van viraal geïnjecteerde dieren zullen volwassen muizen en ratten geofferd worden door middel van cervicale dislocatie. Na afloop van het imaging experiment worden de hersenplakjes gefixeerd voor immunohistochemische analyse.

TD 3. In vivo imaging methode

TD 3.1 Aanbrengen van glazen 'window' voor in vivo imaging

Voor *in vivo* imaging zal gebruikt worden gemaakt van levende dieren, waarbij de virale injecties (TD1.2) worden gecombineerd met het plaatsen van een glazen 'window', om met two-photon microscopie neuropeptideblaasjes te volgen in de cortex van het (volledig verdoofde) dier. Dit maakt het mogelijk om projecties van met fluorescente neuropeptiden geïnfecteerde hersengebieden naar de cortex te bestuderen.

Type dierproeven specifiek voor het neuropeptide oxytocine:

TD 4. Indien nodig: verhogen van oxytocine expressie na virale injectie (TD1.2)

Pilot experimenten zullen uitgevoerd worden in viraal geïnjecteerde dieren om de expressieniveaus van oxytocine te bepalen. Hiervoor zullen ratten worden gebruikt, omdat deze dieren oxytocine hoger tot expressie brengen dan muizen, waardoor de detectiekans sterk wordt verhoogd. Mocht dit niet voldoende zijn, dan zal 'salt loading' toegepast worden om de expressie van oxytocine te verhogen volgens beproefde protocollen (Fields (2012), Ho (1995), Lepetit et al. (1991)). Deze methode is specifiek voor oxytocine en zal niet worden toegepast bij bestudering van andere neuropeptiden. De expressieniveaus verhogen sterk wanneer dieren licht gedehydrateerd raken. Om dieren wel toegang te geven tot drinkwater, kan er zout aan het drinkwater worden toegevoegd 7 dagen voordat het experiment van start gaat (Fields (2012), Ho (1995), Lepetit et al. (1991)). Dit verhoogt de expressie van het neuropeptide oxytocine in de hersenen.

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.

De experimenten beschreven in deze studie zijn sterk complementair en zullen zo veel mogelijk parallel worden uitgevoerd (zie figuur 4). Alle benodigde apparatuur, virale partikels, muizenlijnen en mankracht zijn aanwezig om dit

9	
10	



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 van Amsterdam	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	In Utero Elektroporatie

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.

Het hoofddoel van deze studie is om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en de effecten van neuropeptideafgifte op lokale netwerkactiviteit te begrijpen. Om tot dit doel te komen is het nodig om neuropeptide vesicles in hersencellen fluorescent te labelen door middel van *in utero* elektroporatie (IUE). IUE is een standaard methode waarbij embryo's een DNA injectie in het brein ontvangen, en het DNA via een elektrische lading in de hersencel wordt gebracht (voor review artikelen, zie Nishimura et al. 2012 and Taniguchi et al. 2012). IUE heeft als voordeel dat we in jonge dieren expressie kunnen waarnemen en meerdere embryo's per operatie kunnen gebruiken. De moedermuis met embryo's worden in de laatste week van de zwangerschap geofferd, waarna neuropeptide transport en afgifte mechanismen worden bestudeerd in hersenplakjes met behulp van fluorescentiemicroscopie. Primaire uitkomstparameters zijn: neuropeptide vesicle-dynamiek (snelheid en richting parameters), aantal vesicle fusie-events na stimulatie (door middel van elektrische stimulatie of via optogenese), en locatie van fusie-events. Deze kwantitatieve parameters worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wild-type nestgenoten.

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.

Deze procedure zal bestaan uit de volgende stappen:

1. Applicatie van DNA constructen in breinen van ongeboren foetussen.

Door middel van IUE zullen DNA constructen in het brein van ongeboren foetussen (E7-E16) ingebracht

worden. Onder anesthesie wordt de uterus van zwangere moederdieren blootgelegd en embryo's geïnjecteerd met DNA constructen in het brein gevolgd door stimulatie met externe elektroden om het DNA in specifieke brein gebieden (hippocampus) tot expressie te brengen. Peri-operatieve pijnstilling zal aan het moederdier worden gegeven.

2. De geïnjecteerde dieren zullen geofferd worden door middel van cervicale dislocatie op 2 verschillende tijdstippen na het inbrengen van de DNA constructen: om effecten van neuropeptiden te bestuderen tijdens hersenaanleg zullen zwangere moederdieren worden geofferd op E18 door middel van cervicale dislocatie waarna embryo's uit de uterus gehaald en gedecapiteerd. Breintjes worden gedissecteed en hersenplakjes gebruikt voor microscopische analyses. Cervicale dislocatie en decapitatie worden zonder verdoving uitgevoerd, omdat anesthetica inwerken op de hersenen en invloed hebben op eiwitcomplexen en synaptische netwerken, waardoor ze tot een verstoord beeld leiden en interfereren met dit onderzoek.

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

Kwalitatieve analyse:

Het aantal dieren is gebaseerd op jarenlange ervaring van ons en van collega-onderzoekers. IUE is een zeer reproduceerbare methode om DNA tot expressie te brengen in specifieke hersengebieden en de DNA constructen zijn door ons uitvoerig getest *in vitro* en *in vivo*. Wij schatten de uitval van dieren door te lage expressie van de constructen en/of mistargeting van de doelgebieden op 10% van de geïnjecteerde embryo's. Mocht de succesrate tijdens het project nog verder verbeteren, dan zal de groepsgrootte worden verlaagd.

Kwantitatieve analyse:

Neuropeptide dynamiek en fusie zal worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wildtype littermates. Power analyses zullen worden gebruikt om de groepsgrootte te bepalen. Groepsgrootte calculaties zijn uitgevoerd met de volgende parameters: p-value van 0.05 en een power van 80%. Deze waarden worden standaard toegepast in wetenschappelijk onderzoek en zijn internationaal geaccepteerde normen voor een statistisch betrouwbare proef. Op basis van onze resultaten uit *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van tenminste 20%. Samen met een verlies van 10% van de dieren, zoals uitgelegd in de vorige alinea, resulteert dit een maximum van $14 + 10\% = 16$ moederdieren per experiment.

Deze aantallen zijn als volgt berekend:

Voor de *in utero* elektroporatie zal uitgegaan worden van effect size van 20% , $\alpha=0.05$ en een power van 0.80. Met een poweranalyse kan dan de groepsgrootte worden bepaald voor een goede statistische analyse: voor een Wilcoxon-Mann-Whitney test zijn dan 325 metingen per experiment per groep nodig. Per embryo kunnen gemiddeld 2 hersenplakken van de regio van interesse worden gemaakt. Per hersenplak kunnen 4 metingen worden uitgevoerd. Per embryo kunnen daarom gemiddeld 8 metingen worden uitgevoerd. Voor de Mann-Whitney zijn daarom $(325/8=)$ 41 embryo's nodig per experimentele groep. Bij IUE worden gemiddeld 6 embryo's per moeder geïnjecteerd, gelijk aan 48 metingen per IUE. Om een goede statistische analyse te kunnen uitvoeren, zijn daarom 7 moeders per groep nodig. Een typisch experiment bestaat uit een experimentele groep (een knock-out dier) en een controlegroep (wild-type littermates). De controlegroep is essentieel om een vergelijking te kunnen maken tussen de mutant dieren en de wild-type situatie. Voor beide groepen accepteren we een gelijke foutmarge (0.05) en power (0.8) voor een statistisch betrouwbare proef, waardoor de groepsgrootte voor beide groepen gelijk is. Daarom zijn 14 moederdieren nodig hebben om één

experiment uit te voeren. Tijdens dit onderzoek zal rekening gehouden worden met een verlies van 10%, door uitval van embryo's als gevolg van de elektroporatie, mistargeting van het DNA construct en lage elektrofysiologische activiteit van de hersencellen na de bereiding van hersenplakken, waardoor er op 16 moederdieren per experiment wordt gerekend.

Voor de beantwoording van de eerste drie onderzoeksvragen (projectvoorstel 3.4.1, figuur 1, subdoel 1.1-1.3) zullen 7 genotypen worden getest. Dit staat gelijk aan (7 genotypen x 3 onderzoeksvragen =) 21 experimenten. Voor het bereiken van de drie subdoelen zijn daarom 336 moedermuizen nodig, overeenkomend met 2.016 embryo's, waarvan de helft tot de controlegroep behoort (wildtype) en de andere helft tot de experimentele groep behoort (mutant muizen).

16 moederdieren, gelijk aan 96 embryo's, zijn ingecalculeerd voor de karakterisatie van de DNA constructen en het bepalen van de expressieprofielen.

Muizen	Moedermuizen	Embryo's
Karakterisatie DNA constructen	16	96
Experimentele groep	168	1008
Controle groep (Wild-type littermates)	168	1008
Totaal	352	2112

B. De dieren

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

Diersoorten en herkomst: Voor dit experiment worden muizen aangekocht bij een erkende fokker of in-huis gefokt.

Geslacht: Omdat gebruik wordt gemaakt van zwangere dieren, zullen alleen vrouwtjesdieren worden geopereerd.

Levensstadia: vrouwtjes vanaf 8 weken oud zullen gebruikt worden voor de fok. Embryo's van E7-E16, van beide geslachten, zullen gebruikt worden voor de elektroporatie en voor de bevalling worden gedecapiteerd.

Geschatte aantallen: voor dit onderzoek zijn 352 moedermuizen en 2112 pups benodigd over een periode van vijf jaar.

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. Voor deze proeven is geen *in silico* vervanging mogelijk. Voor studies naar biologische processen in het brein zijn muizen en ratten de beste modellen vanwege de mogelijkheid van genetische modificatie (knock-outs).

Vermindering. Door statistisch onderbouwde groepsgrootte en onze eerder opgebouwde ervaring kunnen we het aantal benodigde dieren zo klein mogelijk houden. De procedures beschreven in de project zijn gebaseerd op wetenschappelijke en experimentele ervaring in muizen. Alle chirurgische handelingen en imaging technieken zijn volledige geoptimaliseerd. Power calculaties voor groepsgroottes met realistische parameters zorgen dat het minimaal aantal dieren gebruikt zal worden en toch waardevolle data verkregen zal worden. Wij proberen zo optimaal mogelijk te werken door zoveel mogelijk materiaal te verzamelen bij elke proef.

Verfijning. Alle procedures zijn uitvoerig getest door ons en onze collega's. Wij onderhouden nauw contact met andere laboratoria die IUE elektroporaties uitvoeren, waardoor wij up to date blijven met de expertise in het veld. Experimenten zullen opeenvolgend uitgevoerd worden en waar nodig zullen kleine karakterisatiestudies gedaan worden om te bepalen hoe het grootst mogelijke resultaat behaald kan worden met zo min mogelijk dieren.

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.

Na de operatie zullen moederdieren dagelijks gecontroleerd worden op diverse parameters (gewicht, groei, vacht conditie, gedrag). Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en geschoolde onderzoekers. De chirurgische ingegrepen zullen plaatsvinden onder adequate anesthesie en peri-operative pijnstilling. De dieren zullen dagelijks worden gemonitord door middel van wegen. Dit zal een goede indruk geven of de zwangerschap normaal verloopt.

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.

Wij onderhouden nauw contact met collega's en zijn op de hoogte van de wetenschappelijke literatuur over dit onderwerp, waardoor herhaling niet voor komt.

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.

Alle operaties zullen plaatsvinden onder anesthesie en adequate pijnstilling.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Na de operatie wordt een dier mogelijk apart gehuisvest. Er zijn zelden complicaties tijdens de ingreep. De dieren zullen nauwlettend worden gemonitord. Bij uitzondering (<1% in praktijk) kunnen de embryo's komen te overlijden na de ingreep, dit kan een abortus veroorzaken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Dieren worden apart gehuisvest om te kunnen herstellen van de operatie. Door de elektroporatie kan het voorkomen dat een moeder een embryo verliest door een abortus (<1% in praktijk).

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

Er is ruime expertise aanwezig om ervoor te zorgen dat het aantal complicaties minimaal zal zijn. Alle procedures worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers. De dieren ontvangen voldoende pijnstilling om pijn te verlichten en stress te voorkomen. De dieren zullen gezamenlijk worden gehuisvest wanneer meerdere dieren zijn geopereerd. Peri-operatieve monitoring zal zorgvuldig uitgevoerd worden aan de hand van welzijnsdagboeken. In het geval van complicaties, zoals bijvoorbeeld slecht herstellen van de operatie, zal het dier nauwkeurig onderzocht worden om tot een goede beslissing te komen.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren zullen nauwlettend in de gaten gehouden worden. Wanneer meer tekenen van ongerief worden vertoond dan verwacht, bijvoorbeeld >20% gewichtsverlies ten opzichte van het begingewicht, abnormaal/onverwachts gedrag, slechte verzorging en/of een gebogen rug of de wond hersteld slecht of niet compleet na operatie, worden de dieren getermineerd.

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

Verwachting is dat dit zal plaatsvinden bij <1% van de gevallen.

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.

Dier	Percentage dieren	Handeling	Ongerief
Moederdier	100%	Oppakken, handelen	Licht
	100%	Anesthesie	Licht
	100%	Operatie	Matig
	100%	Cervicale dislokatie	Licht
Embryo's	100%	<i>In utero</i> elektroporatie	Matig
	100%	Decapitatie	Licht

Cumulatief ongerief voor zowel de moedermuizen als de embryo's wordt daarom ingeschat als matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het brein zal uitgerepareerd worden en gebruikt voor verdere analyses. De moeder en de embryo's zullen onverdoofd worden gedecapiteerd om de volgende redenen: (1) sedatie door inhalatie of injectie veroorzaakt een sterke stressrespons in de dieren. Verhoogde corticosteron niveaus hebben een aangetoonde grote invloed op moleculaire, biochemische en fysiologische processen. Om deze processen zo natuurlijk mogelijk te kunnen bestuderen, wordt deze stressrespons hiermee voorkomen. (2) De meeste verdovingsmiddelen hebben een interactie met de processen die hier bestudeerd worden. CO₂ induceert bijvoorbeeld acidose, en veel anesthetica beïnvloeden neurotransmissie en biochemische signaal transducties. (3) Onverdoofde decapitatie is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verscheidene DEC comités in de afgelopen jaren. We hebben deze methode als onze standaardmethode overgenomen, en al onze studies van de afgelopen jaren zijn op deze manier uitgevoerd. Voor de vergelijkbaarheid van de huidige met de toekomstige resultaten, zouden we deze manier van decapiteren graag toepassen in dit huidige protocol.

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.

x 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
<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Virale injecties evt. gevolgd door salt loading en/of in vivo imaging

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Ons doel is om via virale injecties biologische processen in de hersencellen te labelen met fluorescente eiwitten. Door gemodificeerde virussen te gebruiken die fluorescente eiwitten tot expressie brengen en die direct in de hersenregio's van jong volwassen te injecteren, kunnen we heel specifiek neuropeptide vesicles, synapsen en axonen labelen in de target cellen. Uit onze pilot experimenten is gebleken dat na enkele dagen expressie van de fluorescente eiwitten waar te nemen is, en kunnen de hersenen van de dieren gebruikt worden voor het bestuderen van afgiftemechanismen van neuropeptiden. Specifiek voor het neuropeptide oxytocine zal indien de expressie niet op waarneembare niveaus komt 2% zout aan het drinkwater worden toegevoegd om expressie van dit neuropeptide te verhogen. Deze methode wordt gebruikt bij onze collega Prof. Grinevich in Heidelberg en werkt zeer efficiënt (Knobloch et al., 2012).

Na de virale injecties worden de hersenen gebruikt voor bereiden van hersenplakken, of de levende dieren worden gebruikt voor imaging van neuropeptide transport en afgifte. In beide gevallen staan de hersencellen met elkaar in verbinding en worden omgeven door hun ondersteunende glia cellen. Primaire uitkomstparameters zijn: neuropeptide vesicle-dynamiek (snelheid en richting parameters), aantal vesicle fusie-events na stimulatie (door middel van elektrische stimulatie of via optogenese), en locatie van fusie-events. Deze kwantitatieve parameters worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wild-type nestgenoten.

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.

Deze procedure bestaat uit de volgende stappen:

1. Applicatie van virale particles in breinen van (jong) volwassen muizen en ratten door middel van een stereotactische operatie. Met behulp van Bregma coördinaten van de muis/rat-hersenenatlas kan zeer nauwkeurig de hersenenregio van interesse worden getarget. Het virus zal met behulp van een fijne naald in het brein van volwassen muizen en ratten ingebracht worden (SOP bijlagen in de werkprotocollen). Dit gebeurt onder adequate anesthesie en preoperatieve pijnstilling. Experimenten voor de karakterisatie van de DNA constructen zullen worden gebruikt om de expressieniveaus te bepalen van virale particles die nog niet eerder getest zijn.

2. Indien, naar aanleiding van de resultaten van het karakterisatie-experiment, de expressie van het neuropeptide oxytocine te laag blijkt om waar te nemen, zal salt loading worden toegepast. Dit zal gebeuren na een voldoende herstelperiode door 2% NaCl (w/v) aan het drinkwater toe te voegen.

3a. Een deel van de dieren zullen geofferd worden door middel van cervicale dislocatie op verschillende tijdstippen na het inbrengen van de virale particles, afhankelijk van construct en vraagstelling. Cervicale dislocatie en decapitatie zullen zonder verdoving worden uitgevoerd, omdat anesthetica inwerken op de hersenen. Anesthetica hebben invloed op eiwitcomplexen en synaptische netwerken, waardoor ze tot een verstoord beeld leiden en interfereren met dit onderzoek. Indien salt loading wordt gebruikt, zal dit op minimaal 2 dagen na het aanbieden van 2% NaCl geschieden. Dit zal beschreven worden in de werkprotocollen. Het brein zal worden gedissecteed en verder gebruikt worden voor analyses.

3b. Op basis van de resultaten van punt 3a, kan er besloten worden tot *in vivo* imaging. Een deel van de dieren zal tijdens de applicatie zoals beschreven onder punt 1, een glazen venster aangebracht krijgen in de schedel van de muis en ratten (Knobloch et al., 2012). Dit alles zal plaats vinden tijdens dezelfde operatie als beschreven in punt 1. Twee van onze AIOs en een analist hebben een uitgebreide training ondergaan in het plaatsen van craniale windows bij muizen in het lab van Prof. Grinevich. Tijdens deze training behaalde wij een successrate van 90%.

De dieren worden gemonitord zoals beschreven in bijlage 1. Na een herstelperiode zullen de dieren onder anesthesie gebracht worden en gefixeerd worden onder een two-photon microscoop, om zo neuropeptide dynamiek te imagen door het glazen window.

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

Kwalitatieve analyse:

Wij schatten de uitval van dieren door te lage expressie van de constructen en/of mistargeting van de doelgebieden op 10% van de geïnjecteerde dieren.

Kwantitatieve analyse:

Neuropeptide dynamiek en fusie zal worden vergeleken tussen knock-out muizen en hun wildtype littermates. Experimenten voor het neuropeptide oxytocine zullen worden uitgevoerd in ratten. Power analyses zullen worden gebruikt om de groepsgrootte te bepalen. Uit ons *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van 20%. Groepsgrootte calculaties zijn uitgevoerd met de volgende parameters p-value van 0.05 en een power van 80%. Deze waarden worden standaard toegepast in wetenschappelijk onderzoek en zijn internationaal geaccepteerde normen voor een statistisch betrouwbare proef. Op basis van onze resultaten uit *in vitro* onderzoek verwachten wij een effect size van 20%. Samen met een verlies van 10% van de dieren,

zoals uitgelegd in de vorige alinea, resulteert dit in 91 dieren per experiment.

De aantallen zijn als volgt berekend:

Voor de virale injectie zal uitgegaan worden van effect size van 20% , $\alpha=0.05$ en een power van 0.80. Met een poweranalyse kan dan de groepsgrootte worden bepaald voor een goede statistische analyse: voor een Wilcoxon-Mann-Whitney test zijn 325 metingen per experiment per groep nodig. Van viraal geïnjecteerde dieren zullen veelal hersenplakken gemaakt worden. Gemiddeld kan per hersenplak 2 metingen worden gedaan. Van een volwassen dier kunnen 4 hersenplakken bereid worden met de regio van interesse. Voor de Mann-Whitney zijn daarom (325 metingen/8 metingen per dier=) 41 dieren nodig per experimentele groep. Een typisch experiment bestaat uit een experimentele groep (een knock-out dier) en een controlegroep (wild-type littermates). De controlegroep is essentieel om een vergelijking te kunnen maken tussen de mutant dieren en de wild-type situatie. Voor beide groepen accepteren we een gelijke foutmarge (0.05) en power (0.8) voor een statistisch betrouwbare proef, waardoor de groepsgrootte voor beide groepen gelijk is. Daarom zijn 82 dieren nodig om één experiment uit te voeren. Tijdens dit onderzoek zal rekening gehouden worden met een verlies van 10%, door uitval van dieren als gevolg van de operatie, mistargeting van het DNA construct en lage elektrofysiologische activiteit van de hersencellen na de bereiding van hersenplakken. Het aantal dieren per experiment komt dan op 91 dieren.

Voor onderzoek op wild-type muizen worden 3 experimenten ingecaluleerd om de 3 subonderzoeksvragen te beantwoorden (zie projectvoorstel 3.4.1). Daarom zullen (3x91 dieren) 273 wildtype dieren benodigd zijn voor dit onderzoek. Voor onderzoeken op mutante muizen zullen 7 experimenten ingecaluleerd worden, overeenkomend met 637 muizen. Hiervan zal de controlegroep bestaan aan wildtype muizen. Deze dieren zullen ingezet worden om onderzoeksvragen te beantwoorden die betrekking hebben tot de eiwitten en calcium sensoren voor neuropeptideafgifte.

De experimenten voor oxytocine zullen uitgevoerd worden in ratten. Hiervoor zijn 3 experimenten ingecaluleerd, om de 3 subonderzoeksvragen te beantwoorden (zie projectvoorstel 3.4.1.), gelijk aan 273 ratten. Wanneer de expressie van het neuropeptide oxytocine te laag is, zal salt loading toegepast worden. Salt loading heeft alleen effect op het neuropeptide oxytocine, en zal niet worden toegepast voor andere neuropeptiden. Er zijn drie onderzoeksvragen die betrekking hebben tot oxytocine. Daarom zal op maximaal (273 ratten + 10% loss=) 301 salt loading worden toegepast. Omdat dit een extra behandeling is na de operatie, neemt het aantal dieren hierdoor niet toe.

In vivo imaging zal enkel toegepast worden wanneer relevante resultaten zijn behaald in hersenplakken van muizen en/of ratten. Onze ervaring leert dat 25% van de experimenten aanleiding geeft tot vervolgonderzoek *in vivo*. Daarom zullen 3 à 4 van de in totaal 13 onderzoeken (3 wildtype muis, 7 mutant muis, 3 rat) vervolgd worden *in vivo*. Er zullen dus maximaal 364 dieren worden gebruikt voor *in vivo* imaging, plus 10% verlies, is 401 dieren. Omdat dit een beslissing is die wordt gemaakt op basis van de resultaten van de eerste onderzoeken, zijn er nieuwe dieren nodig voor het plaatsen van het glazen window. Het totaal aantal dieren van alle onderzoeken komt hierdoor op 1667 dieren.

Neuropeptiden moduleren vele lange-termijn processen. Voorbeelden daarvan zijn synaps-aantallen, synapsmorfologie, neuronale exciteerbaarheid, axonale connectiviteit en dense-core vesicle fusie processen. Omdat deze veranderingen traag zijn, is het van belang om de dieren op meerdere tijdstippen te kunnen

imagen over een periode over enkele weken tot maanden. De dieren zullen een imagingsessie ondergaan van maximaal 60 minuten per sessie, met een maximum aantal imagingsessies van 20 keer, en maximumfrequentie van twee maal per week. Hiermee zal het tijdsbestek van morfologische en fysiologische veranderingen voldoende worden gevangen en kan adequaat antwoord worden gegeven op de eerder gestelde onderzoeksvragen.

Experiment	Aantal dieren
Muizen voor karakterisatie constructen DNA	46
Ratten voor karakterisatie constructen DNA	46
Wildtype muizen	273
Mutant muizen	637
Ratten (evt. Incl. salt loading)	301
<i>In vivo</i> imaging muis	273
<i>In vivo</i> imaging rat (evt. Incl. salt loading)	91
Totaal	1667

B. De dieren

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

Diersoorten en herkomst: Voor dit experiment worden muizen en ratten aangekocht bij een erkende fokker en of worden geleverd door een onderzoekslab van Prof. Valery Grinevich in Heidelberg waarmee wij nauwe samenwerking onderhouden.

Geslacht: Voor de virale injecties worden mannetjes en vrouwtjes gebruikt.

Levensstadia: dieren vanaf P1 kunnen gebruikt worden voor de virale injecties.

Geschatte aantallen: over een periode van vijf jaar zullen 1667 dieren virale injecties ontvangen, waarvan maximaal 392 ratten daarnaast ook salt loading zullen ontvangen, indien nodig. Van de 1667 dieren worden maximaal 364 dieren ingezet voor *in vivo* imaging. Het aantal benodigde dieren is gebaseerd op onze ervaring en de ervaring van andere labs waar deze technieken worden gebruikt. De schatting is gebaseerd op het aantal betrokken onderzoekers en valt binnen het bereik van de beschikbare fondsen.

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. Voor deze proeven is geen *in silico* vervanging mogelijk. Voor studies naar biologische processen in het brein zijn muizen en ratten de beste modellen vanwege de mogelijkheid van genetische modificatie (knock-outs).

Vermindering. Door statistisch onderbouwde groepsgrootte en onze eerder opgebouwde ervaring kunnen we het aantal benodigde dieren zo klein mogelijk houden. De procedures beschreven in de project zijn gebaseerd op wetenschappelijke en experimentele ervaring in muizen. Alle chirurgische handelingen en imaging technieken zijn volledige geoptimaliseerd. Power calculaties voor groepsgroottes met realistische parameters zorgen dat het minimaal aantal dieren gebruikt zal worden en toch waardevolle data verkregen zal worden.

Verfijning. Alle procedures zijn uitvoerig getest door ons en onze collega's. Wij onderhouden nauw contact met andere laboratoria die virale injecties uitvoeren, waardoor wij up to date blijven met de expertise in het veld. Wij proberen zo optimaal mogelijk te werken door zoveel mogelijk materiaal te verzamelen bij elke proef. Experimenten zullen opeenvolgend uitgevoerd worden en waar nodig zullen kleine karakterisatiestudies gedaan worden om te bepalen hoe het grootst mogelijke resultaat behaald kan worden met zo min mogelijk dieren.

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.

De dieren zullen dagelijks gecontroleerd worden op diverse parameters (gewicht, groei, vacht conditie, gedrag). Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en geschoolde onderzoekers. Waar mogelijk zullen de ingegrepen plaatsvinden onder adequate anesthesie en peri-operatieve pijnstilling. Er zal na de ingreep een pijnstiller worden gegeven.

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.

Wij onderhouden nauw contact met collega's en zijn op de hoogte van de wetenschappelijke literatuur over dit onderwerp, waardoor herhaling niet voor komt.

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?
<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag H.
<input type="checkbox"/> 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?
<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag I.
<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Worden in dat geval verdooving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?
<input type="checkbox"/> Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.
<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.
Chirurgische ingrepen zullen worden uitgevoerd onder anesthesie en peri-operatieve pijnstilling.
I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen
Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
Er zijn zelden complicaties tijdens de ingreep. De dieren zullen nauwlettend worden gemonitord. Wanneer een dier meer tekenen van ongerief vertoont dan verwacht, wordt het dier getermineerd.
Na de operatie wordt een dier mogelijk apart gehuisvest.
Bij de dieren waarbij een glazen venster is aangebracht bestaat de mogelijkheid dat het venster loslaat. Deze dieren zullen direct getermineerd worden. Ervaring leert ons dat het venster erg stabiel is en blijft het venster zonder problemen voor meer dan een jaar op het dier aanwezig kan blijven.
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.
Hoewel het zelden voorkomt, heeft elke (chirurgische) ingreep de kans op onverwachte nadelige effecten. Geopereerde dieren worden met elkaar gehuisvest, maar wanneer slecht één dier een operatie heeft ondergaan, zal deze apart gehuisvest worden.
Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.
Er is genoeg expertise aanwezig om ervoor te zorgen dat het aantal complicaties minimaal zal zijn. Alle procedures worden uitgevoerd door zeer ervaren onderzoekers. De dieren ontvangen voldoende pijnstilling om pijn te verlichten en stress te voorkomen. De dieren zullen gezamenlijk worden gehuisvest wanneer meerdere dieren zijn geopereerd. Peri-operatieve monitoring zal zorgvuldig uitgevoerd worden aan de hand van welzijnsdagboeken. In het geval van complicaties, zoals slecht herstellen van de operatie, zullen de dieren nauwkeurig onderzocht worden om een beslissing te maken.
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.

xJa > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren zullen nauwlettend in de gaten gehouden worden. Wanneer meer tekenen van ongerief worden vertoond dan verwacht, bijvoorbeeld >20% gewichtsverlies ten opzichte van het hoogste gemeten lichaamsgewicht, abnormaal/onverwachts gedrag, slechte verzorging en/of een gebogen rug of de wond hersteld slecht of niet compleet na operatie, worden de dieren getermineerd.

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

De verwachting is dat dit zal plaatsvinden bij <1% van de gevallen.

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.

Dier	Percentage dieren	Handeling	Ongerief
Muis of rat voor hersenplakken	100%	Oppakken, handelen	Licht
	100%	Anesthesie voor operatie	Licht
	100%	Operatie: virale injectie	Matig
	20%	Operatie: plaatsen glazen window	Matig
	16,8%	Salt loading	Matig
	20,3%	Anesthesie voor imaging	Licht
	100%	Decapitatie	Licht

Het cumulatief ongerief voor zowel muis als rat word ingeschat als matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het brein zal uitgerepareerd worden en gebruikt voor verdere analyses. De dieren zullen onverdoofd worden gedecapiteerd om de volgende redenen: (1) sedatie door inhalatie of injectie veroorzaakt een sterke stressrespons in de dieren. Verhoogde corticosteron niveaus hebben een aangetoonde grote invloed op moleculaire, biochemische en fysiologische processen. Om deze processen zo natuurlijk mogelijk te kunnen bestuderen, wordt deze stressrespons hiermee voorkomen. (2) De meeste verdovingsmiddelen hebben een interactie met de processen die hier bestudeerd worden. CO₂ induceert bijvoorbeeld acidose, en veel anesthetica beïnvloeden neurotransmissie en biochemische signaal transductie. (3) Onverdoofde decapitatie is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verscheidene DEC comités in de afgelopen jaren. We hebben deze methode als onze standaardmethode overgenomen, en al onze studies van de afgelopen jaren zijn op deze manier uitgevoerd. Voor de vergelijkbaarheid van de huidige met de toekomstige resultaten, zouden we deze manier van decapiteren graag toepassen in dit huidige protocol.

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.

x Ja



Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam van de portefeuillehouder	[REDACTED]
KvK-nummer	53815211
NVWA deelnemernummer	11200

2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN)
Geef aan welk nummer u invult.

<input type="checkbox"/> KvK-nummer	[REDACTED]
<input checked="" type="checkbox"/> BSN	[REDACTED]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Adres of postbus	[REDACTED]	
Postcode en Plaats	[REDACTED] Amsterdam	

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?
 Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?
 Ja > Ga door naar vraag 4
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u 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

4 Ondertekening

- 4.1 Ondertekenen het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde	[Redacted]
Datum	0 2 - 0 9 - 2 0 1 6
Handtekening portefeuillehouder van de instelling	[Redacted]
Handtekening gemachtigde	[Redacted]

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11200
2. Titel van het project:
Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein
3. Titel van de NTS:
Mechanismen van neuropeptideafgifte en -transport
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: *20-07-2016*
 - aanvraag compleet: *20-07-2016*
 - in vergadering besproken: *13-09-2016 en 08-11-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *04-10-2016 en 09-01-2017*
 - advies aan CCD: *16-1-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *20-07-2016*
 - 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: *20-09-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg over de samenhang, de achtergrond, de context en de humane eindpunten. De leeftijd van de dieren moet duidelijker worden weergegeven. Enkele tekstuele en lay-out opmerkingen.*
- Datum antwoord: *04-10-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 8 nov 2016.*

Vraagronde 2

- Datum: 09-11-2016
- Strekking gestelde vragen: *De NTS en aantallen moet nog aangepast worden conform de veranderingen in de rest van de aanvraag.*
- Datum antwoord: 09-01-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- 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*

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. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: N.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het onderzoeken van de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en -signalering in de hersenen, en richt zich op de effecten van neuropeptideafgifte op de lokale netwerkactiviteit.*

5. *Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen. Neuropeptiden zijn verder betrokken bij allerlei neurologische en psychiatrische processen, zoals angst en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht en epilepsie.*
6. *De fundamentele kennis is nodig om de afgifte en regulatie van neuropeptiden beter te begrijpen, en zal bijdragen aan onderzoek naar de onderliggende mechanismen van neuropeptide-dysfunctie bij patiënten met hersenaandoeningen.*

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

7. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het onderzoeken van de mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en -signalering in de hersenen: de proefdieren, de onderzoekers en in de toekomst 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 fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen. Ook mensen met neurologische en psychiatrische aandoeningen, zoals angst en stemmingsstoornissen, autisme, overgewicht en epilepsie kunnen voordeel hebben bij de resultaten van dit onderzoek.

8. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *N.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

9. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

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.

10. 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.

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 op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor hersenaandoeningen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

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

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

12. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Na de operatie wordt een dier apart gehuisvest om te kunnen herstellen van de operatie.*

13. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

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

Er wordt licht ongerief verwacht bij alle dieren als gevolg van handelingen, anesthesie en doden. Matig ongerief wordt verwacht ten gevolge van de operatie (virale injectie of plaatsen van glazen window), salt loading en in utero elektroporatie. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen.

14. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan.

15. 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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht, gedrag of de dieren niet herstellen na de operatie. De verwachting dat dit zal plaatsvinden is echter heel klein (< 1 %).

3V's

16. *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.*

Er zijn zoveel mogelijk metingen uitgevoerd in in vitro-preparaten, waaronder zenuwcellen verkregen uit stamcellen. Het doel van dit onderzoek is om de mechanismen van neuropeptide-

afgifte en het effect van deze afgifte op de ontvangende hersengebieden te bestuderen, hiervoor zijn intacte hersengebieden nodig. Voor de onderzoeksvragen in deze studie zijn op dit moment geen niet-invasieve technieken beschikbaar, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

De keuze voor het gebruik van muizen en ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De muis is het best bestudeerde model op het gebied van de neurobiologie. Hierdoor kan men de resultaten vergelijken met andere (inter)nationale onderzoekslaboratoria. De beschikbaarheid van transgene muizenmodellen is essentieel om onderzoek te kunnen doen naar de mechanismen van neuropeptide-afgifte. In één specifiek geval zal men gebruik maken van ratten: als blijkt dat de expressie van oxytocine in de muizenhersenen niet hoog genoeg is om dit te kunnen waarnemen, zal men ratten gebruiken, omdat ratten dit neuropeptide in veel hogere mate tot expressie brengen dan muizen.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Verder worden er uit 1 dier meerdere gegevens (hersensplakken) gehaald, waardoor er minder dieren 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 3693 muizen en 438 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

18. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

De dieren krijgen tijd om te acclimatiseren en worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

19. 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: N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

20. 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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Voor type dierproef 1 zal men gebruik maken van zwangere vrouwelijke muizen, daarnaast zullen muizen embryo's van beide geslachten worden gebruikt. Voor type dierproef 2 zal men gebruik maken van dieren van beide geslachten, dus zowel vrouwelijke als mannelijke muizen en ratten.

21. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

De dieren worden gedood om de hersenen verder te kunnen analyseren. De dieren zullen worden gedood door onverdoofde decapitatie. Dit is noodzakelijk omdat de meeste verdovingsmiddelen interactie vertonen met de onderzoeksprocessen. Sedatie verhoogd de corticosteron levels, welke invloed hebben op de moleculaire biochemische en fysiologische processen. Deze manier van doden is uitgebreid bediscussieerd en geaccepteerd door verschillende DEC comités in de afgelopen jaren en de huidige IvD en DEC zijn het hiermee eens.

22. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

23. 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 (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

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 mechanismen die ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en daarmee de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen het gebruik van maximaal 3693 muizen en 438 ratten in de dierproef die daarvan maximaal 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 matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een therapie voor de behandeling van neuropeptiden gerelateerde hersenaandoeningen.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 3693 muizen en 438 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen 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. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is onderzoeken welke mechanismen ten grondslag liggen aan neuropeptideafgifte en –signalering in de hersenen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen, is afgewogen tegen het, als maximaal 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 3693 muizen en 438 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en indirecte maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de mechanismen van neuropeptideafgifte en zullen indirect bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van neuropeptide gerelateerde hersenaandoeningen.

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

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk belang en indirect maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 3693 muizen en 438 ratten en het daarbij verwachte maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

T.a.v. [REDACTED]

**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
AVD112002017824

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD112002017824. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017824

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11200

Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Amsterdam

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 53815211

Straat en huisnummer: De Boelelaan 1105

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

IBAN:

Tenaamstelling van het
rekeningnummer:

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam

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
AVD112002017824

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 januari 2017
Vervaldatum: 16 februari 2017
Factuurnummer: 170824

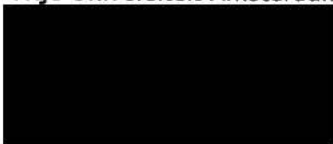
Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD112002017824	€ 1.287,00

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit 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
AVD112002017824
Bijlagen
1

Datum 23 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" met aanvraagnummer AVD112002017824. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

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 "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dec-Vu-Vumc gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 januari 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:
23 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017824

Bezwaar

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

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

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

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


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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze: 

Ir. G. de Peuter
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 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "Mechanismen van neuropeptideafgifte en -signalering in het intacte brein" met aanvraagnummer AVD112002017824, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dec-Vu-Vumc. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 In Utero Elektroporatie				352 moedermuizen en 2112 embryo's
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / 352 moedermuizen en 2112 embryo's (E7-16); wiltype en KO muizen voor calciumsensoren	2.464	100% Matig	
3.4.4.2 Virale injecties evt. gevolgd door salt loading en/of in vivo imaging				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / Wildtypen en KO voor calciumsensoren	1.229	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	438	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD112002017824

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:

AVD112002017824

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD112002017824

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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