

		Inventaris Wob-verzoek W17-07								
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.		document NTS 2017828	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS initieel			x					
3		NTS aangepast	x							
4		Projectvoorstel				x		x	x	
5		Bijlage animal procedure 1			x					
6		Bijlage animal procedure 2 initieel			x					
7		Bijlage animal procedure 2 aangepast			x					
8		Bijlage animal procedure 3				x		x	x	
9		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10		Mail aanvullende informatie				x		x	x	
11		DEC advies				x		x	x	
12		Advies CCD		x						x
13		Beschikking en vergunning				x		x	x	



23 JAN 2017

Aanvraag**Projectvergunning Dierproeven**
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11200	
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen			
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	53815211
		Straat en huisnummer	de Boelelaan 1105
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>	Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01-03-2017

Einddatum 28-02-2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

De pontine kernen in het controleren van bewegingen

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

De Pontine kernen in het controleren van bewegingen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres Amsterdam | Nederland

E-mailadres

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur *

Inkoopordernummer: [REDACTED]

Factuuradres:

[REDACTED]

Amsterdam

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ 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

Functie

Plaats

Amsterdam

Datum

18-01-2017

Handtekening

[REDACTED]



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De Pontine kernen in het controleren van bewegingen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Hersenwetenschappen, fundamenteel, muizen, bewegingsstoornissen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Bewuste bewegingen zijn een essentieel onderdeel van het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Deze aandoeningen hebben een relatief hoge incidentie. Alleen al de cerebellaire ataxia's, waarbij bewegingen ongecoördineerd zijn, hebben een incidentie rond de 5 op 100.000, wat betekent dat er alleen al in Nederland ongeveer 1.000 patiënten zijn met ataxie. Een andere veel voorkomende bewegingsaandoening, dystonie, waarbij spiercontracties onwillekeurig en ongecontroleerd zijn, komt bij ongeveer 12.000 patiënten in Nederland voor. Bewegingsstoornissen zijn ook vaak aanwezig in combinatie met andere verschijnselen, zoals bijvoorbeeld bij Huntington's (~2.000 patiënten in Nederland). Het gaat hier dus om een grote patiëntengroep waarvoor behandelmethode niet of zeer beperkt aanwezig zijn. Om deze ziektes te behandelen moeten we eerst de
---	---

onderliggende oorzaken vinden. Om dit te bereiken moeten we een uitgebreide karakterisatie doen van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen.

Binnen dit project zullen we kijken naar de communicatie tussen de grote en de kleine hersenen. Beide zijn intensief betrokken bij bewuste bewegingen: vanuit de grote hersenen komen de commando's om te bewegen terwijl de kleinen hersenen betrokken zijn bij de verfijning van bewegingen. Hoe deze twee gebieden samenwerken om bewegingen aan te sturen is vrijwel volledig onbekend. Het project heeft tot doel de communicatie tussen de grote en kleine hersenen te onderzoeken.

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

Het project is vooral fundamenteel wetenschappelijk van karakter. Het doel van het onderzoek is dan ook in de eerste plaats het vergroten van onze kennis van de aansturing van bewegingen. Op langere termijn zal dit onderzoek kunnen bijdragen aan de behandeling van aandoeningen op het gebied van beweging.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen, 400 dieren

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

Alle muizen zullen een operatie moeten ondergaan wat leidt tot matig ongerief. Een deel van de dieren zal ook gedurende de tijd van de proef geen vrije toegang tot water hebben om gedrag tijdens het onderzoek te sturen. Dit zou kunnen leiden tot een onaangenaam gevoel van dorst bij de proefdieren. Verder wordt een deel van dieren met het hoofd vastgezet in een proefopstelling. Dit zogenaamde fixeren van het dier geeft vooral in de eerste twee sessies extra stress.

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

Matig ongerief: 400

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden tijdens of na de proeven gedood om de hersenen buiten het lichaam te kunnen bestuderen.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Er is op het moment geen vervanging voor deze proeven. Om onderzoek te doen aan de basale principes van gedrag of van de hersenen zullen dieren gebruikt moeten worden. Het is namelijk niet mogelijk om de verbindingen tussen hersendelen te onderzoeken zonder dieren te gebruiken aangezien er geen kennis bestaat om deze verbindingen in vitro na te bootsen.

4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden

Het aantal dieren is geminimaliseerd door gebruik te maken van een geoptimaliseerde proefopstellingen en door gebruik te maken van de

verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

nieuwste technieken.

4.3 Verfijning

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

Het doel van het onderzoek is meer inzicht verkrijgen in de aansturing van bewegingen van zoogdieren en zo in de toekomst betere behandelmethoden voor bewegingsziekten te kunnen ontwikkelen. Hierdoor is de bestudering van het zenuwstelsel van 'simpelere' dieren zoals fruitvliegen en slakken niet geschikt. Aangezien we met dit onderzoek fundamentele aspecten van de aansturing van bewegingen in zoogdieren, als model voor de mens, willen onderzoeken hebben we gekozen voor een van de meest gebruikte (en dus waar veel ervaring mee is) model dieren, namelijk de muis. De hersenen van de muis lijken sterk op die van primaten zoals de mens, hierdoor zijn resultaten van dit onderzoek gemakkelijk te vertalen naar toepasbaarheid in de mens.

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

Iedere operatie zal worden uitgevoerd door getrainde wetenschappers. Alle dieren worden onder diepe anesthesie gebracht voor aanvang van operaties en rondom de operatie wordt pijnstilling gegeven aan de dieren om het ongerief zo laag mogelijk te houden. Dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd. Ook zijn er humane eindpunten gedefinieerd om onnodig lijden te voorkomen, dit zal slechts zeer zelden nodig zijn (<5%).

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1	Vul uw	11200
.1	deelnemersnummer van de	
1	Vul de naam van de	Vrije Universiteit Amsterdam
.2	instelling of organisatie in.	
1	Vul de titel van het	De pontine kernen in het controleren van bewegingen
.3	project in.	

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Bewuste bewegingen zijn een essentieel voor het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij

bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Deze aandoeningen hebben een relatief hoge incidentie. Alleen al de cerebellaire ataxia's, waarbij bewegingen ongecoördineerd zijn, hebben een incidentie rond de 5 op 100.000, wat betekent dat er alleen al in Nederland ongeveer 1.000 patiënten zijn met ataxie. Een andere veel voorkomende bewegingsaandoening, dystonie, waarbij spiercontracties onwillekeurig en ongecontroleerd zijn, komt bij ongeveer 12.000 patiënten in Nederland voor. Bewegingsstoornissen zijn ook vaak aanwezig in combinatie met andere verschijnselen, zoals bijvoorbeeld bij Huntington's (~2.000 patiënten in Nederland). Het gaat hier dus om een grote patiëntengroep waarvoor behandelmethode(n) niet of zeer beperkt aanwezig zijn.

Om deze ziektes in de toekomst te behandelen dienen we eerst de onderliggende oorzaken vinden. Om dit te bereiken moeten we een uitgebreide karakterisatie doen van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden onderzoeken die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen.

Motor commando's worden gegenereerd in de motor schors van de grote hersenen waarna deze commando's naar hersenkernen in de hersenstam gestuurd worden. De kleine hersenen (cerebellum) verfijnen bewegingen door de activiteit in deze hersenstamkernen te reguleren. Ze doen dit door sensorische informatie uit het gehele brein en het lichaam te combineren met het motor commando gegenereerd in de grote hersenen. De algemeen geldende hypothese is dat een hersenstructuur, de pontine kernen welke gesitueerd zijn tussen de grote en kleine hersenen, dit motor commando doorgeven van de grote naar de kleine hersenen. Maar het bewijs dat de pontine kernen dit motor commando slechts doorgeven zonder verdere bewerkingen hierop uit te voeren is erg zwak.

In feite weten we niets over deze voorste pontine kernen: De inputs, mogelijke informatieverwerking, en convergentie van verschillende inputs is allemaal onbekend. Dit gat in onze kennis belemmert ons een compleet overzicht en begrip te hebben van de aansturing van bewegingen, en belemmert ons vermogen ziektes van het bewegingsapparaat te behandelen.

In dit voorgestelde onderzoek willen de wetenschappers onderzoeken welke gebieden in de hersenen input geven naar de voorste pontine kernen, hoe deze informatie wordt verwerkt en gecombineerd en welke rol de voorste pontine kernen precies spelen in beweging. Dit doen we door een combinatie van anatomisch, elektrofysiologisch en gedragsmatig onderzoek in muizen. De betrokken hersenstructuren zijn goed vergelijkbaar tussen mens en muis, en de gedragstaak in muizen is direct te vergelijken met overeenkomstige bewegingen bij de mens.

[REDACTED]. De wetenschappelijke aspecten van dit onderzoek zijn beoordeeld en excellent bevonden door voorselectie, peer-review en een commissie van wetenschappers. [REDACTED]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit onderzoek richt zich er op om inzicht te verkrijgen in de basale werking van de pontine kernen. Specifiek zal de hypothese worden onderzocht dat de pontine kernen informatie integreren en verwerken van verschillende bronnen, en daarom niet alleen maar een doorgeefluik zijn, maar een essentieel onderdeel van het systeem dat bewuste bewegingen aanstuurt. Deze hypothese zal onderzocht worden via drie subdoelen:

1. Het identificeren van hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau
2. Onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronen in de pontine kernen.

3. Vaststellen wat en hoe de pontine bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen verzorgt.

Voor dit onderzoek is er financiering beschikbaar voor de komende vijf jaren. Het afronden van het gehele onderzoek wordt dan ook in deze tijdsspanne geschat. De hoofdonderzoeker op de aanvraag heeft meer dan tien jaar ervaring op het gebied van anatomie, fysiologie en gedrag. Bovendien heeft de afdeling waar het onderzoek gedaan wordt ruime expertise op al deze gebieden. Dit komt onder andere tot uitdrukking in het groot aantal opgeleide PhD studenten en publicaties in toonaangevende wetenschappelijke tijdschriften zoals Neuron, Nature Communications, Nature Neuroscience en eLife. Daarnaast heeft de hoofdaanvrager van dit protocol internationale en nationale samenwerkingen op het gebied van elektrofysiologie en gedrag. Hierdoor zijn de subdoelen haalbaar binnen vijf jaar.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

De pontine kernen zijn de grootste bron van input naar de kleine hersenen. In de kleine hersenen komt sensorische informatie binnen vanaf de periferie van het zenuwstelsel, en wordt daar gecombineerd met input vanaf de voorste pontine kernen welke meer dan de helft van alle input naar de kleine hersenen bevat. Maar, er is zeer weinig tot niets bekend over de voorste pontine kernen. Slechts een handvol publicaties beschrijft enkele elektrofysiologische eigenschappen van neuronen in de pontine kernen. Gedetailleerde, cel-specifieke onderzoeken ontbreken helemaal (subdoel 1) en het is onbekend of en hoe informatie van verschillende bronnen wordt gecombineerd (subdoel 2). Tenslotte is het onbekend wat de pontine kernen precies bijdragen aan het systeem voor het controleren van bewuste bewegingen (subdoel 3). Deze zaken zijn noodzakelijk voor ons begrip van de pontine kernen, en onmisbaar om te begrijpen hoe de hersenen bewegingen aansturen.

Maatschappelijk belang

Als we ooit bewegingsziektes doeltreffend willen behandelen, dan is het van belang alle aspecten van de aansturing van beweging te begrijpen. Ziektes die effect hebben op de aansturing van de beweging hebben een relatief hoge incidentie. In Nederland zijn er ongeveer 15.000 patiënten met aandoeningen aan de controlering van bewuste bewegingen waar geen therapie voor beschikbaar is. Bovendien worden deze ziektes gekenmerkt door een lage kwaliteit van leven en hoge kosten voor de maatschappij (López-Bastida *et al.*, 2008). Als we de onderliggende oorzaken van deze ziektes beter begrijpen, dan wordt het mogelijk behandelingen te formuleren en uiteindelijk de kwaliteit van leven van patiënten te verbeteren van patiënten.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het onderzoek is opgebouwd uit drie onderdelen:

1. Het identificeren van hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau.
Met anatomisch onderzoek zullen we identificeren welke gebieden van de hersenen input geven naar de voorste pontine kernen. Hiervoor gebruiken we een combinatie van transgene muizen en tracing (aankleuren van projecties) met (aangepaste) virussen.
2. Onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronen in de pontine kernen.

Uitkomsten van doel 1 zullen gebruikt worden om gericht elektrofysiologisch onderzoek te

doen naar de verbindingen (synapsen) gevormd op neuronen in de voorste pontine kernen. Ook zullen we tijdens dit onderdeel onderzoeken hoe verschillende inputs samenkomen in een pontine kern neuron. Hiervoor gebruiken we virussen die een eiwit tot expressie brengen in neuronen waarmee we deze neuronen kunnen stimuleren met licht (optogenetica, Yizhar *et al.*, 2011) We kunnen beginnen met het werk aan doel 2 voordat alle studies naar doel 1 zijn afgerond. Zodra er resultaten zijn behaald waarbij we gebieden hebben geïdentificeerd die projecteren naar de pontine kernen, kunnen we beginnen met functionele onderzoeken.

3. Vaststellen wat en hoe de pontine kernen bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen verzorgt.

Om direct de rol van de voorste pontine kernen in gedrag te testen zullen muizen getraind worden op een gedragstaak. De muis moet op een knop drukken en die weer loslaten om een beloning te verkrijgen.

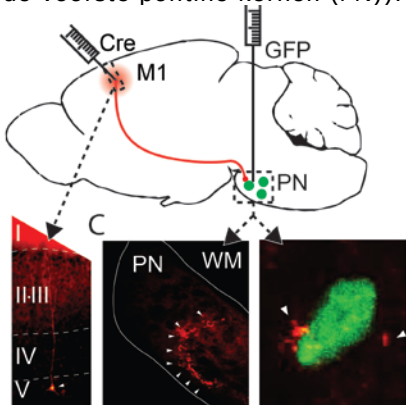
. Muizen ondergaan een operatie waarbij virus wordt geïnjecteerd, of waarbij elektrodes worden geïmplanteerd. Na een herstelperiode van enkele dagen tot enkele weken zullen de muizen de taak uitvoeren en zullen de voorste pontine kernen op specifieke momenten (met milliseconde precisie) worden uitgeschakeld, of er zullen opnames gemaakt worden van hersenactiviteit via de geïmplanteerde elektrodes. De combinatie van het opnemen van de neuronale activiteit en het moduleren van die activiteit tijdens gedrag zijn krachtige gereedschappen om de werking van een zenuwverbinding aan te tonen.

Muizen hebben een zenuwstelsel dat heel goed te vergelijken is met dat van de mens. Bovendien kunnen we in muizen belangrijke gedragingen onderzoeken die vergelijkbaar zijn met die wij als mensen maken (b.v. een reikbeweging om iets te pakken). Verder zijn er verschillende technieken beschikbaar die wij alleen in muizen kunnen toepassen, zoals bepaalde transgenen of virus injecties. In dit voorgestelde onderzoek gebruiken we een combinatie van anatomie, elektrofysiologie en gedragsonderzoek. Deze drie aanpakken geven complementaire inzichten in hoe de voorste pontine kernen werken. Anatomie zal gedaan worden met een transgene muis waarmee verbindingen in de hersenen gevisualiseerd kunnen worden. Complementair hieraan zal van geïdentificeerde verbindingen de functie onderzocht worden met behulp van elektrofysiologie. Uiteindelijk zal het algehele belang van de verwerking van signalen in de pontine kernen onderzocht worden met een gedragstaak.

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

1. Anatomie

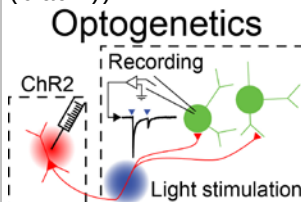
Voor dit subdoel ondergaan de muizen een operatie waarbij onder diepe anesthesie enkele gaten in de schedel geboord zullen worden en virus geïnjecteerd zal worden. Na een periode van enkele dagen tot weken zal het dier worden gedood en worden de hersenen onderzocht voor anatomische doeleinden (Zie figuur hieronder voor een voorbeeld van injectie (Cre) in motor cortex (M1) en synapsen op neuronen in de voorste pontine kernen (PN)).



2. Electrofysiologie

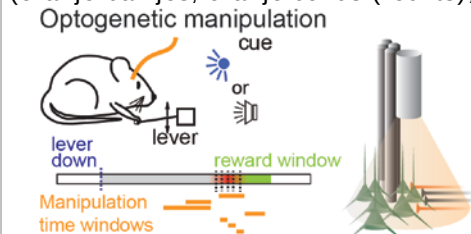
Voor dit onderdeel ondergaan muizen eerst een operatie waarbij virus zal worden geïnjecteerd in de

hersen. Met dit virus kunnen we in plakjes van de hersenen specifieke zenuwbanen stimuleren (Yizhar *et al.*, 2011). De muizen zullen enkele dagen tot weken overleven waarna ze zullen worden gedood en de hersenen zullen worden onderzocht met elektrofysiologie (Zie de figuur hieronder voor een schema van het experiment. Virus met een eiwit voor stimulatie met licht (ChR2) wordt geïnjecteerd in neuronen (rood, links). Verbindingen naar andere neuronen (groen) kunnen gestimuleerd worden met licht (blauw)).



3. Gedrag

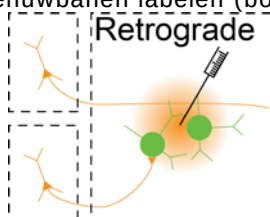
Voor dit onderdeel ondergaan de muizen een operatie waarbij of virus geïnjecteerd zal worden, of elektrodes worden geïmplanteerd. Ook wordt er een bevestigingspunt op de schedel geplaatst om de muis in de experimentele opstelling vast te kunnen zetten met het hoofd. Dit vastzetten van het hoofd is nodig voor het uitvoeren en meten van de gedragstaak. Na een herstelperiode van enkele dagen tot weken zullen de dieren gedragsmatige training ondergaan om de gedragstaak te leren. Voor dit leren is het noodzakelijk dat de dieren voldoende gemotiveerd zijn om de taak uit te voeren. Hiervoor gebruiken we de veelgebruikte aanpak van water restrictie. Muizen zullen gedurende de dag-nacht cyclus geen vrije beschikking hebben over water, maar hun water inname moeten verdienen via het uitvoeren van de gedragstaak. Eventueel tekort zal (gedeeltelijk) aangevuld worden nadat de dieren iedere dag uit de opstelling worden gehaald (Zie de figuur hieronder voor een schematisch overzicht van het gedrag. De muis drukt op een knop (lever) in respons op een licht of geluid (cue). De muis drukt de knop in (lever down) en krijgt dan na een bepaalde tijd het signaal voor loslaten, waarna de muis een waterbeloning krijgt (reward window). Tijdens dit gedrag kunnen we neuronen in de pontine kernen manipuleren (oranje balkjes, oranje conus (rechts), of opnemen via elektrodes (rechts).)



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

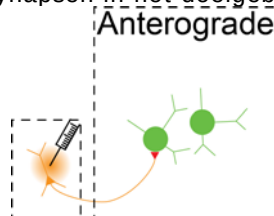
1. Anatomie

Als eerste zal onderzocht worden welke gebieden input geven aan de pontine kernen. Eerst zal er algemeen inzicht verkregen worden over de aanvoerende gebieden door zogenaamde retrograde tracers. Deze techniek werkt goed om een eerste inzicht te krijgen over aanvoerende gebieden, maar is niet geschikt om definitief uitsluitsel te geven over synaptische contacten (Zie ook de figuur hieronder die laat zien dat retrograde tracer injecties (rechts) zowel echte contacten (onder, oranje) als passerende zenuwbanen labelen (boven, oranje)).



Vervolgens zullen we gebruik maken van zogenaamde anterograde tracers. Dit is een essentiële stap aangezien uitkomst van dit onderdeel bepaalt waar precies de volgende injecties gedaan worden om de synapsen in de pontine kernen te onderzoeken. Het is echter niet nodig om alle anatomie af te ronden

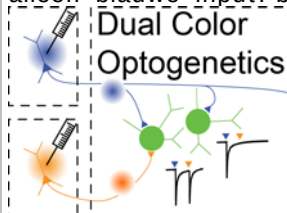
voor er begonnen kan worden met de elektrofysiologische onderzoeken. Zodra er gebieden in de hersenen geïdentificeerd zijn die input geven aan de pontine kernen kan er begonnen worden met elektrofysiologie (Zie ook de figuur hieronder die dezelfde verbindingen laat zien als met de retrograde tracers, maar alleen de echte verbinding (onder) zal resulteren in het aankleuren van vezelbanen en synapsen in het doelgebied (oranje neuron, rode synaps)).



Alleen gebieden waarbij we echte synaptische contacten hebben geïdentificeerd (zoals hierboven bij de anterograde tracers) zullen verder worden geanalyseerd met elektrofysiologie (Zie ook schema onderaan).

2. Electrofysiologie

De invloed van de verschillende gebieden die projecteren naar de pontine kernen zal onderzocht worden in hersenplakjes van muizen. Eerst zullen we gebieden die input geven aan de pontine kernen injecteren met een virus dat het mogelijk maakt hersencellen te stimuleren met licht (Yizhar *et al.*, 2011). Na enkele weken kunnen experimenten worden uitgevoerd op het weefsel van deze muizen om te bepalen wat de eigenschappen zijn van de synaptische input. In dit verband zullen we vooral kijken naar de grootte van de synaptische input en de korte-termijn plasticiteit. Er zal ook specifiek gekeken worden naar hoe verschillende inputs samen de neuronen in de pontine kernen beïnvloeden. Dit zal gedaan worden op basis van eerdere anatomische onderzoeken. Als er aanwijzingen zijn vanuit onze anatomische onderzoeken dat bepaalde hersengebieden overlappende projecties sturen naar de pontine kernen, dan zullen wij deze potentiële overlap functioneel onderzoeken. Er zal in dit geval op twee plaatsen virus geïnjecteerd worden om twee verschillende inputs te kunnen stimuleren met twee verschillende golflengtes licht (Zie hieronder voor een schematisch voorbeeld. Om stimulatie met blauw licht mogelijk te maken zal er virus worden geïnjecteerd in een aanvoerend gebied (boven, blauw). Stimulatie met oranje licht zal mogelijk gemaakt worden door injectie van een ander virus (onder, oranje). Door te stimuleren met twee verschillende kleuren licht (blauw en oranje, rechts) en tegelijkertijd opnames te maken van de activiteit van neuronen in hersenplakjes (rechts), kunnen we evalueren of beide inputs binnenkomen op een neuron (vergelijk de twee traces aan de rechterkant, alleen 'blauwe' input: boven, combinatie van input: onder)).



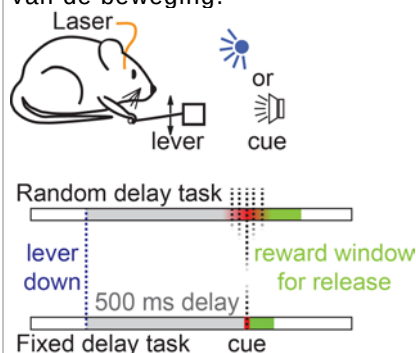
Dit deel van de experimenten geeft ons inzicht in hoe signalen van verschillende hersengebieden worden getransformeerd en gecombineerd door de synapsen in de pontine kernen. Hiermee kunnen we voorspellen hoe de neuronen in de pontine kernen signalen veranderen die ze binnenkrijgen van andere gebieden. Deze voorspelling zullen we vervolgens testen met het derde blok experimenten.

3. Gedrag

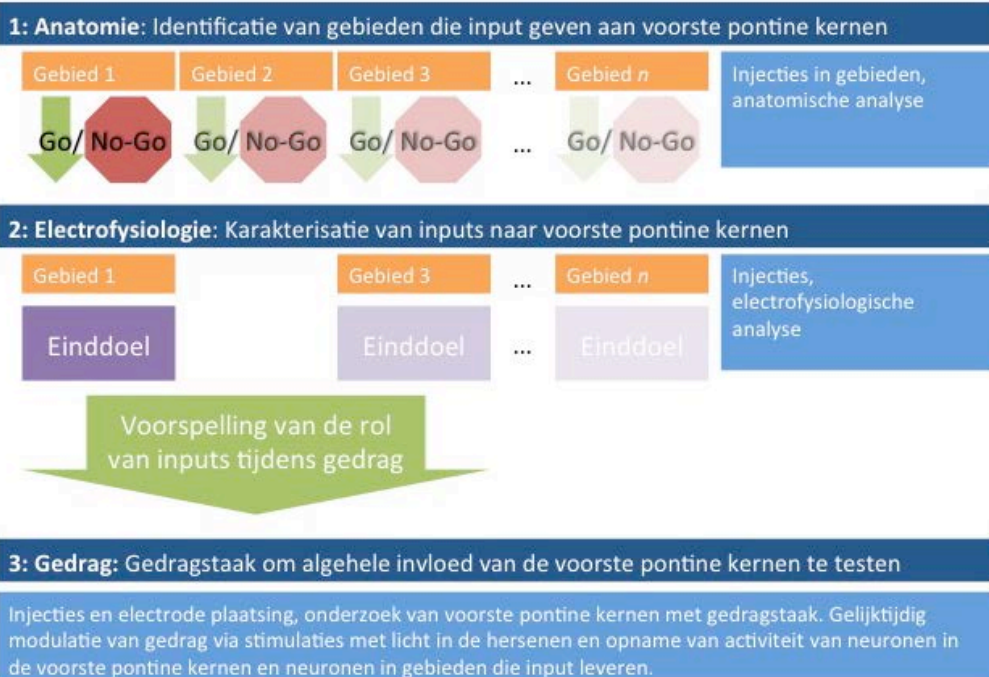
De functie van de pontine kernen tijdens gedrag zal onderzocht worden door tijdens de uitvoering van een beweging en tijdens het leren van een beweging de pontine kernen kortstondig uit te schakelen. Dit kan worden gedaan door virus te injecteren in de pontine kernen waarmee we met licht neuronen kunnen uitschakelen. Door tijdens gedrag korte lichtpulsjes te geven wordt zo de output van de pontine kernen geblokkeerd.

De muis wordt getraind een knop in te drukken en ingedrukt te houden tot het een signaal krijgt de knop los te laten. Van deze gedragstaak gebruiken we twee varianten: variabele en vaste timing tussen indrukken en signaal tot loslaten (zie figuur hieronder, variable timing: Random

delay task; vaste timing: Fixed delay task). Met de eerste variant kunnen we de directe invloed van de pontine kernen op beweging onderzoeken. Immers, het teken voor de muis om los te laten wordt door de onderzoeker gegeven en is niet te voorspellen door het dier, en we kunnen dus net voor, tijdens of net na het 'loslaat signaal' kort de pontine kernen uitschakelen en zo de invloed van de pontine kernen op bewegingen onderzoeken. De tweede variant van het taakje zal zijn dat de tijd tussen indrukken en het signaal tot loslaten vast ligt. Hierdoor kan de muis voorspellen wanneer het signaal tot loslaten komt, en zal dus leren de knop precies los te laten op het moment van het signaal (dit maximaliseert immers de beloning voor de muis, zie onder). Zodra de muis dit geleerd heeft zullen we de timing veranderen waardoor de muis langer of korter de knop ingedrukt moet houden. Dit is dus een leertaak, en we kunnen tijdens deze variant onderzoeken wat de rol van de pontine kernen is voor het leren van bewegingen door de pontine kernen kortstondig uit te schakelen tijdens het leren van de nieuwe timing van de beweging.



Tijdens dit gedrag kunnen we ook de neuronale activiteit in de voorste pontine kernen en in afferente structuren meten. Door onze eerdere onderzoeken in de anatomie kunnen we verschillende hersengebieden doelgericht bekijken en het vuurgedrag van de neuronen vergelijken met de voorste pontine kernen. Ook kunnen we een vergelijking maken met de fysiologie in plakjes. Immers, tijdens deze experimenten hebben we een directe voorspelling kunnen maken hoe de pontine kernen signalen veranderen. Deze voorspelling zullen we direct testen door tijdens gedrag activiteit te meten in afferente hersengebieden en de pontine kernen zelf. Door het voorpatroon van bijvoorbeeld de motor cortex te vergelijken met het vuurpatroon van de pontine kernen, kunnen we bepalen hoe de pontine kernen het signaal van de motor cortex veranderen voor het door te geven aan de kleine hersenen.



3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Anatomische studies
2	Studies electrofysiologie
3	Studies met gedrag
4	
5	
6	
7	
8	
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 Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Anatomie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is een overzicht van projecties naar de pontine kernen en de overlap van verschillende projecties. Hiervoor zijn verschillende technieken mogelijk, maar alleen de aanpak met virusinjecties geeft de mogelijkheid om zowel de projectie als de synapsen te detecteren. Conventionele tracers zullen worden gebruikt om retrograad te traceren (d.w.z. vanaf het doelgebied terug naar de aanvoerende gebieden.) Eerst zal er onderzoek gedaan worden met retrograde tracers in een beperkt aantal dieren om eventuele inputs naar de voorste pontine kernen te identificeren. Daarna zal er anterograde tracing (d.w.z. vanaf het aanvoerende- naar het doelgebied toe) gedaan worden.

Met tracers kunnen alleen de vezelbanen aangekleurd worden, en is er geen uitsluitel te geven over daadwerkelijke contacten tussen neuronen. Door gebruik te maken van transgene muizen kunnen we naast de vezelbanen ook synaptische contacten detecteren. Deze aanpak is niet mogelijk in andere diersoorten en levert een belangrijke bijdrage aan de waarde van de data van de proef.

Op basis van literatuur verwachten wij dat verschillende gebieden in de hersenen projecties naar dezelfde subgebieden, of zelfs naar dezelfde neuronen, in de pontine kernen sturen. Om hier inzicht in te verkrijgen maken we gebruik van verschillende virus injecties in transgene dieren. Per muis zullen er twee injecties gedaan worden, één in ieder van de te onderzoeken gebieden. Deze injecties kleuren de twee verschillende pathways aan met een verschillende kleur, en ze zorgen er voor, in combinatie met het transgen in de muis, dat de synapsen in deze pathways ook kunnen worden onderzocht. Deze twee injecties gebeuren direct na elkaar tijdens één operatie.

Muizen zullen worden geïnjecteerd met virus of een conventionele tracer om input naar de pontine kernen te onderzoeken. Muizen zullen na injectie enkele dagen tot weken overleven waarna ze onder diepe anesthesie zullen worden geperfuseerd. Hierna zullen er hersenplakjes worden gemaakt voor anatomische onderzoeken.

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteerd in de hersenen met virus of een conventionele tracer. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

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

De muis zal worden geanestheseerd en in een stereotact geplaatst worden, ear bars zullen worden ingesmeerd met pijnstillende crème. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt.

In de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden. Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geperfuseerd voor anatomische onderzoeken. Na fixatie worden de hersenen uitgediepte en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor observatie en analyse onder de microscoop.

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

Schattingen voor het aantal dieren zijn gebaseerd op referentie injecties weergegeven op de Allen Brain Atlas (Mouse connectivity: <http://connectivity.brain-map.org>). (Voor details, zie uitleg per proef) Verder is er zeer beperkt tot geen andere literatuur beschikbaar. Bovendien gaat het hier om kwalitatieve proeven en zijn de uitkomsten van de proeven niet uit te drukken in statistische significanties.

B. De dieren

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

In totaal zijn drie proeven nodig: retrograde tracing om gebieden te identificeren die input geven, anterograde tracing om te bevestigen dat geïdentificeerde gebieden daadwerkelijk inputs geven, en dubbele anterograde tracing om het samenkomen van informatie te kunnen detecteren.

Retrograad

Muis: Wild type, eigen fok (indien beschikbaar) of gekocht. Zowel vrouwtjes als mannetjes zullen worden gebruikt.

Injectie dag postnataal 20 tot 30 (p20-p30), perfusie vanaf p30. We willen de projecties naar de pontine kernen in beeld brengen in (jong) volwassen dieren. Voor een goed vergelijk met onze fysiologische experimenten (dierproeven 2 & 3) is een startpunt van 30 dagen goed.

Initieel: twintig dieren voor retrograde injecties met retrobeads. Retrograde injecties geven snel een volledig overzicht van mogelijke inputs. Injecties zullen moeten worden geplaatst in de grijze stof van de pontine kernen, een relatief klein gebied in de hersenen. Hierdoor is de verwachting dat enkele injecties niet goed geplaatst zullen zijn. We verwachten een uitval van 50% voor deze injectie omdat het geïnfecteerde gebied klein moet zijn, goed geplaatst, maar wel groot genoeg moet zijn om het grootste deel van de pontine kernen te raken. Deze schatting van de grootte van het doelgebied, gecombineerd met de vorm van het doelgebied en het belang van exclusie van omliggende is tot stand gekomen met behulp van de Allen Brain Atlas. Met vijf geslaagde injecties hebben we genoeg data om de retrograde tracing kwalitatief te kunnen beoordelen. Maar we willen tegelijkertijd genoeg dieren hebben voor deze proef, dus initieel vragen we 20 dieren aan, maar voegen een go/ no-go moment toe waarbij we alleen dieren gebruiken tot we vijf geslaagde injecties hebben. Dus in totaal maximaal **20 dieren**.

Anterograad enkele injecties

Muis: Transgeen Synaptophysin-tdTomato, Eigen fok. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Injectie: p20-30, perfusie vanaf p35. Het virus moet enkele dagen tot weken tot expressie komen in de hersenen, dus vanaf 35 dagen oud (voor dieren geïnjecteerd op p20) kunnen we dieren gebruiken.

Per gebied geïdentificeerd met retrograde injecties zullen we anterograde tracing doen. Dit is belangrijk aangezien retrograde injecties een risico hebben vezels te labelen die slechts passerend zijn, maar geen

contact maken (zie projectvoorstel). Om deze confounding factor te voorkomen moeten we ook anterograde tracing doen. Verder kijken we direct naar synaptische contacten door synapsen aan te kleuren. Hiervoor gebruiken we een transgene muizenlijn waarbij de synaptische contacten fluorescent gelabeld zijn.

Op basis van literatuur en de mouse connectivity atlas (zie bovenstaand) verwachten we inputs vanaf vrijwel de gehele sensorische en motorische schors. Verder verwachten we input vanuit enkele gebieden in de kleine hersenen en waarschijnlijk kleine projecties vanuit de non motor of sensorische schors. Voor ieder gebied moeten we data kunnen vergelijken van in ieder geval vijf muizen. Aangezien we tracing doen van een groot aantal gebieden zullen we per gebied eerst drie oefen injecties moeten doen om recht in het doelgebied te kunnen injecteren. Daarna verwachten we een uitval door niet goed geplaatste injecties van ongeveer 30%. Dit betekent dus **per gebied: $3 + 5 / 0.7 = 10$ dieren**. We verwachten in zeven verschillende gebieden inputs te detecteren op basis van de retrograde injecties.

Totaal voor enkele injecties: 70 dieren

Anterograde dubbele injecties

Muis: Transgeen Synaptophysin-tdTomato, Eigen fok. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Injectie: p20-30, perfusie vanaf p35. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken, maar ook vergelijken met de elektrofysiologie. Ook moet het virus enkele dagen tot weken tot expressie komen in de hersenen, dus vanaf 35 dagen oud (voor dieren geïnjecteerd op p20) kunnen we dieren gebruiken.

Voor deze proeven zullen we onderzoeken welke gebieden in de hersenen overlap vertonen in de pontine kernen met de projectie vanaf de motor schors. We kiezen de motorschors omdat dat voor de beantwoording van de vragen onder gedrag de belangrijkste input zal zijn. Ieder input die overlap vertoont met deze projectie zal van belang zijn in de vorming van responsen van neuronen in de pontine kernen tijdens gedrag. Overlap zal vastgesteld worden door injecties te doen met een virus dat de expressie van cre en van een fluorophore drijft. Voor de twee injecties in 1 dieren zullen twee verschillende fluorophores worden gebruikt (twee verschillende kleuren, bv groen en blauw). De cre expressie zal ervoor zorgen dat in dezelfde cellen het transgen in de muis actief wordt wat ervoor zal zorgen dat de synapsen in deze dieren helder rood kleuren. We krijgen zo dus twee verschillende kleuren axonen met daarin helder rood gekleurde synapsen. Hiermee kunnen we vaststellen of de twee projecties verbindingen maken met dezelfde neuronen in de pontine kernen.

De resultaten behaald met de experimenten beschreven in bijlage 1 zullen leidend zijn in de combinatie van gebieden die we gaan injecteren. In de bijlage 1 hebben we 7 gebieden beschreven waarvan het vermoeden bestaat dat ze projecteren naar de pontine kernen. Om overlap te bestuderen van deze gebieden met de primaire motorschors moeten we dus 6 gebieden onderzoeken in combinatie met de motorschors. Het aantal dieren voor deze proef zal daardoor uitkomen op **60 dieren**. Dit aantal is als volgt vastgesteld: 10 dieren per proef, zeven gebieden minus de motor cortex, dus in totaal $(7-1) \times 10$ dieren.

Totaal voor dubbele injecties: 60 dieren

Totaal voor injecties: 150 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

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

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Dit resulteert op twee onafhankelijke manieren in vermindering: Ten eerste heeft dit ons enige houvast gegeven in het inschatten van de projectiegebieden. Maar de kennis wat betreft inputs naar de pontine kernen is op dit moment zeer beperkt en we moeten dus een eerste injectie doen met retrograde tracers om beter inzicht te krijgen in de aanvoerende gebieden naar de pontine kernen. Voor verdere vermindering is er een limiet geplaatst op het aantal projectiegebieden dat in dit onderzoek onderzocht zal worden. Mochten er meer gebieden van interesse gevonden worden, dan zal eventueel een vervolg onderzoek aangevraagd worden met een onafhankelijke overweging. Ten tweede heeft literatuuronderzoek geresulteerd in een goed inzicht in hoe de injecties gedaan moeten worden wat tot gevolg heeft dat de uitval in alle stadia van de proeven geminimaliseerd is.

Verfijning:

Om onze data zo waardevol mogelijk te maken gebruiken we een transgene muis waarin synaptische contacten zijn gelabeld. Hiermee kunnen we direct synapsen identificeren en hierdoor is het niet meer nodig extra injecties te doen om synapsen aan te kleuren.

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen (o.a. Wet op de dierproeven). Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcathetale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. In het verleden zijn er enkele tracing studies gedaan naar verbindingen naar de pontine kernen, maar deze studies houden geen rekening met vezels die dicht bij de pontine kernen komen, maar geen synapsen maken. Ook is er nog nooit een systematische studie gedaan naar deze projecties. De hier voorgestelde experimenten doen dat wel. Het gaat hier dus om nieuwe inzichten die nog niet eerder verkregen zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Ear bars worden ingesmeerd met pijnstillende crème.
De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn te voorkomen.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht. De kans op slecht herstel na de operatie wordt geschat als zeer klein (<1%).

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

K. Classificatie van ongerief

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

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig

Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totale (cumulatief) ongerief	100%	Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen in beeld te brengen. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Injectie en slice fysiologie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is de karakterisatie en convergentie op functioneel niveau van de synapsen gemaakt door inputs naar de voorste pontine kernen. Hiervoor zal er gebruik worden gemaakt van optogenetica (lichtgevoelige eiwitten) wat er voor zorgt dat we axonen met een simpele lichtpuls kunnen stimuleren.

We zullen per afferent gebied, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 1, een injectie doen met een virus dat de expressie van optogenetische eiwitten aandrijft. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Ook kunnen we synaptische inputs naar deze neuronen analyseren. Door korte lichtpulsjes te schijnen op het hersenplakje kunnen we de axonen die we eerder geïnfecteerd hebben stimuleren om te kijken of er inputs van deze projectie binnenkomen in de cellen in de pontine kernen.

We zullen vervolgens per combinatie van afferente gebieden, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 2, een injectie doen met een virus dat de expressie van deze ionkanalen aandrijft. Dat betekent dus dat een gebied waarmee overlap wordt gezien met de motor cortex in de pontine kernen wordt geïnjecteerd met een virus, terwijl de motor cortex ook een injectie krijgt. De twee gebieden krijgen elk een verschillende variant van het virus geïnjecteerd waardoor motor cortex en het tweede gebied elk met een eigen golflengte licht gestimuleerd kunnen worden. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Door korte lichtpulsjes te schijnen op het hersenplakje van verschillende golflengten kunnen we de twee inputs apart van elkaar stimuleren. Hiermee kunnen we dus de convergentie testen op functioneel niveau van twee aparte pathways. Voor deze techniek is het niet nodig dat de plakjes de complete vezelbaan bevatten vanaf het afferente gebied naar de pontine kernen, slechts een kort stuk vezelbaan is voldoende (Jackman *et al.*, 2013)

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteed in de hersenen met virus. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

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

De muis zal worden geanesthetiseerd en in een stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteed. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt. Op de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken.

B. De dieren

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

Karakterisatie van enkele inputs

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken wat de synaptische eigenschappen zijn van de projecties van allerlei gebieden naar de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met een lichtpuls. Ook kunnen we per cel verschillende experimenten doen door bijvoorbeeld te kijken naar korte-termijn plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen. Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 7 gebieden 5×7 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met enkele injecties: 35 dieren

Karakterisatie van convergentie

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken hoe het samenkomen van verschillende inputs invloed heeft op neuronen in de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de voorste pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met lichtpulsen van verschillende golflengte. Per cel kunnen we de verschillende inputs eerst apart en daarna gecombineerd stimuleren om een duidelijk en compleet beeld te krijgen van hoe inputs samenkomen in de pontine kernen.

Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we dus 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 6 gebieden (7 gebieden min de motor cortex) 10×6 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met dubbele injecties: 60 dieren

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie: 95 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk. Op dit moment is er geen informatie beschikbaar over de synaptische eigenschappen van specifieke afferente gebieden.

Vermindering:

De experimenten worden uitgevoerd nadat eerst is vastgesteld in experimenten vermeld onder bijlage 1 dat er inderdaad input verwacht kan worden uit het projectiegebied. Verder worden de experimenten eerst uitgevoerd vanuit een enkel projectiegebied, waarna pas doorgegaan wordt combinatie van projecties vanuit twee gebieden als aangetoond is dat er input is vanuit beide projectiegebieden. Verder gebruiken we de pilotdata om een inschatting te maken van de projectiegebieden en de opbrengst per dier. Nooit zullen we meer dieren gebruiken dan strikt noodzakelijk om aan te tonen dat er inputs zijn vanuit een projectiegebied of vanuit een combinatie van twee projectiegebieden.

Ook gebruiken we de pilot data om een inschatting te maken van onze opbrengst per dier.

Verfijning:

Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcaderale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Er zijn nog nooit studies uitgevoerd waarbij specifieke afferenten gestimuleerd worden.

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.

Ear bars worden ingesmeerd verdovende zalf.

De hoofdhuid wordt verdoofd.

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

In de eerste dag na de operatie zal er eenmaal daags postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

K. Classificatie van ongerief

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

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig
Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief	100%	Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen te onderzoeken. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Injectie en slice fysiologie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is de karakterisatie en convergentie op functioneel niveau van de synapsen gemaakt door inputs naar de voorste pontine kernen. Hiervoor zal er gebruik worden gemaakt van optogenetica (lichtgevoelige eiwitten) wat er voor zorgt dat we axonen met een simpele lichtpuls kunnen stimuleren.

We zullen per afferent gebied, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 1, een injectie doen met een virus dat de expressie van optogenetische eiwitten aandrijft. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Ook kunnen we synaptische inputs naar deze neuronen analyseren. Door korte lichtpulsjes te schijnen op het hersenplakje kunnen we de axonen die we eerder geïnfecteerd hebben stimuleren om te kijken of er inputs van deze projectie binnenkomen in de cellen in de pontine kernen.

We zullen vervolgens per combinatie van afferente gebieden, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 2, een injectie doen met een virus dat de expressie van deze ionkanalen aandrijft. Dat betekent dus dat een gebied waarmee overlap wordt gezien met de motor cortex in de pontine kernen wordt geïnjecteerd met een virus, terwijl de motor cortex ook een injectie krijgt. De twee gebieden krijgen elk een verschillende variant van het virus geïnjecteerd waardoor motor cortex en het tweede gebied elk met een eigen golflengte licht gestimuleerd kunnen worden. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Door korte lichtpulsjes te schijnen op het hersenplakje van verschillende golflengten kunnen we de twee inputs apart van elkaar stimuleren. Hiermee kunnen we dus de convergentie testen op functioneel niveau van twee aparte pathways. Voor deze techniek is het niet nodig dat de plakjes de complete vezelbaan bevatten vanaf het afferente gebied naar de pontine kernen, slechts een kort stuk vezelbaan is voldoende (Jackman *et al.*, 2013)

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteerd in de hersenen met virus. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

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

De muis zal worden geanesthetiseerd en in een stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt. Op de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken.

B. De dieren

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

Karakterisatie van enkele inputs

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken wat de synaptische eigenschappen zijn van de projecties van allerlei gebieden naar de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met een lichtpuls. Ook kunnen we per cel verschillende experimenten doen door bijvoorbeeld te kijken naar korte-termijn plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen. Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 7 gebieden 5×7 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met enkele injecties: 35 dieren

Karakterisatie van convergentie

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken hoe het samenkomen van verschillende inputs invloed heeft op neuronen in de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de voorste pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met lichtpulsen van verschillende golflengte. Per cel kunnen we de verschillende inputs eerst apart en daarna gecombineerd stimuleren om een duidelijk en compleet beeld te krijgen van hoe inputs samenkomen in de pontine kernen.

Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we dus 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 6 gebieden (7 gebieden min de motor cortex) 5×6 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met dubbele injecties: 30 dieren

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie: 65 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk. Op dit moment is er geen informatie beschikbaar over de synaptische eigenschappen van specifieke afferente gebieden.

Vermindering:

De experimenten worden uitgevoerd nadat eerst is vastgesteld in experimenten vermeld onder bijlage 1 dat er inderdaad input verwacht kan worden uit het projectiegebied. Verder worden de experimenten eerst uitgevoerd vanuit een enkel projectiegebied, waarna pas doorgegaan wordt combinatie van projecties vanuit twee gebieden als aangetoond is dat er input is vanuit beide projectiegebieden. Verder gebruiken we de pilotdata om een inschatting te maken van de projectiegebieden en de opbrengst per dier. Nooit zullen we meer dieren gebruiken dan strikt noodzakelijk om aan te tonen dat er inputs zijn vanuit een projectiegebied of vanuit een combinatie van twee projectiegebieden.

Ook gebruiken we de pilot data om een inschatting te maken van onze opbrengst per dier.

Verfijning:

Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcardiale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Er zijn nog nooit studies uitgevoerd waarbij specifieke afferenten gestimuleerd worden.

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.

Ear bars worden ingesmeerd verdovende zalf.

De hoofdhuid wordt verdoofd.

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

In de eerste dag na de operatie zal er eenmaal daags postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

K. Classificatie van ongerief

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

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig
Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief	100%	Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen te onderzoeken. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1	Vul uw	11200
.1	deelnemersnummer van de	
1	Vul de naam van de	Vrije Universiteit Amsterdam
.2	instelling of organisatie in.	
1	Vul het volgnummer en	Volgnummer Type dierproef
.3	het type dierproef in.	3 Gedrag

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van de hier beschreven experimenten is het direct testen van de rol van de projectie van de grote hersenen naar de kleine hersenen via de pontine kernen. De eisen voor een taak die de rol van de voorste pontine kernen kan testen is dat de taak activist moduleert in zowel de kleine als de grote hersenen.

De gedragstaak is simpel en heeft twee varianten die verschillende aspecten van gedrag meten. Beide varianten bestaan er uit dat een muis via het hoofd wordt gefixeerd in de opstelling en dat ze een knop moet bedienen met de rechterpoot. De eerste variant van de taak kijkt naar reactietijden, terwijl de tweede variant vooral kijkt naar leergedrag van timing. We kunnen zeer precies, met milliseconden resolutie, het gedrag van de muis onderzoeken. We kunnen zowel de reactietijden van de dieren onderzoeken als wel de precieze beweging van knop indrukken en loslaten omdat de knop een graduele uitlees mogelijkheid heeft (0-100% i.p.v. aan/uit). Tevens kunnen we met deze taak hersenactiviteit opnemen en manipuleren tijdens het gedrag en daarmee een verband vaststellen tussen hersenactiviteit en gedrag.

Tevens is aangetoond dat de motor schors en de kleine hersenen een belangrijke een onmisbare rol spelen bij het uitvoeren van vergelijkbare taken in verschillende dieren (Kubota, 1996; Holdefer *et al.*, 2005; MacKay 1988; Churchland *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2006; Farr and Whislaw 2002; Kan *et al.*, 1994; Esposito *et al.*, 2014; Heming *et al.*, 2016; Tennant *et al.*, 2011; Harrision *et al.*, 2012)

In de eerste variant drukt de muis de knop in om een trial te starten. Na een willekeurige tijd krijgt de muis een cue via een licht of via een toon. In respons op deze cue moet de muis binnen korte tijd

(vastgesteld door de onderzoeker) de knop loslaten om een beloning te krijgen. Deze variant van de taak test vooral de responsetijden van de muis op de cue.

De tweede variant geeft de cue iedere trial na een vaste tijd. Een muis wordt zo bijvoorbeeld getraind om de knop los te laten na 1 seconde. De muis zal leren dat er iedere keer na de start van een trial een 1 seconde wachttijd is voor de cue, en zijn responsetijden aanpassen om zo snel mogelijk na de cue de knop los te laten en zo zijn beloning te maximaliseren.

Voor beide taken geldt dat de muis werkt voor een beloning in de vorm van water. Muizen hebben een restrictie op hun water inname en moeten hun dorst lessen door beloning te verdienen door de gedragstaak goed uit te voeren. Als een muis te langzaam reageert gedurende een trial dan zal dat worden geclassificeerd als een gemiste trial en krijgt de muis een time-out van enkele seconden.

Voor de implementatie binnen ons lab moeten we enkele proeven doen om de opstelling te testen en te kijken en de proef optimaliseren om dezelfde leercurves krijgen. Hiervoor willen we met een beperkt aantal dieren de proef opzetten.

Vervolgens willen we de rol van de pontine kernen testen bij bewegingen door tijdens het gedrag op verschillende momenten de projecties van de pontine kernen te inhiberen met licht. Hiervoor moeten we virus injecteren om optogenetische gereedschappen tot expressie te brengen in neuronen in de pontine kernen. Deze injectie zal tegelijk worden gedaan met het plaatsen van het vastmaak punt op de schedel van de muis. Tijdens gedrag zal er vervolgens via een glasvezel licht worden geschoten in de hersenen van de muis om de projectie van de pontine kernen te inhiberen.

Een laatste deel van dit onderdeel van het project zal er uit bestaan direct de activiteit van neuronen in de hersenen van de muis te meten tijdens gedrag. Specifiek zullen we de activiteit van neuronen in de afferente gebieden meten en vergelijken met de activiteit in de pontine kernen om te onderzoeken welke transformatie van het signaal de pontine kernen verzorgen.

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.

Er zijn verschillende aspecten aan de procedure. Ten eerste moeten de dieren iedere dag gedurende een paar uur vastgezet worden met het hoofd in de opstelling omdat in verdere experimenten er activiteit opgenomen zal worden van hersencellen in het brein en omdat de activiteit van hersencellen zal worden gemeten en worden gemoduleerd met optogenetica. Ten tweede is er het leren van de taak zelf. Ten derde en tenslotte moeten alle dieren die in de proef gaan waterdeprivatie ondergaan. Dit zal er voor zorgen dat de dieren bereid zijn te werken voor een beloning in de vorm van water

Iedere muis zal een implantaat op de schedel krijgen waarmee de muis gefixeerd kan worden in de opstelling. Dit is nodig om in experimenten activiteit te meten van neuronen en om stimulaties te geven met licht in de hersenen van muizen. Iedere muis zal een metalen bevestigingspunt op de schedel krijgen waarmee de muis eenvoudig gefixeerd kan worden in de opstelling. Het totale gewicht van dit implantaat is zeer gering (~2 gram) waardoor het eenvoudig en zonder last door een muis gedragen kan worden.

Verder zal er bij een aantal dieren een virus injectie gedaan worden en zal er een lichtvezel worden geïmplantéerd in de hersenen. Deze twee ingrepen zullen in dezelfde operatie worden uitgevoerd als de plaatsing van het bevestigingspunt.

Bij een aantal andere dieren zullen extra gaten in de schedel worden geboord om tijdens experimenten toegang te kunnen verkrijgen tot de hersenen met elektrodes. De gaten zullen worden afgedicht met een kleine kunststof cilinder met schroefdop, of er zullen direct elektrodes worden geïmplantéerd waarna de schedel weer wordt gesloten met tandarts cement.

Procedure:

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. De muis zal worden geanestheseerd en in een stereotact geplaatst worden (ear bars zullen worden ingesmeerd met pijnstillende zalf). De ogen zullen tegen uitdroging beschermd worden met oogzalf aangebracht direct op de oogbol. De huid over de schedel zal worden geschoren worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. De schedel wordt verdoofd en daarna goed gereinigd en ontdaan van het periost op de plaats waar het bevestigingspunt geplaatst zal worden. De schedel zal worden opgeruwd.

Vorbereidingen voor optogenetics: Voordat het bevestigingspunt op de schedel zal worden gezet, worden er eerst gaten geboord in de schedel (aan de hand van stereotactische coördinaten) om virus injecties te doen. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna er verder gegaan zal worden met het plaatsen van een lichtvezel. Een dunne lichtvezel (enkele tientallen tot honderden micrometers in diameter) zal worden geplaatst boven het injectiegebied, of boven het doelgebied van de injectie. De vezel zal worden geplaatst met de stereotact aan de hand van stereotactische coördinaten. De vezel bestaat uit een uiteinde dat in hersenen geplaatst wordt en een uiteinde met een bevestigingspunt voor de externe vezel. Het gehele implantaat is zeer kort. Hierdoor loopt de muis in the thuiskooi met slechts een klein uitstekend deel op de schedel (<1 cm) en niet met een lange vezel. Als de vezel op de plaats zit wordt deze kort vastgezet met dental cement. Direct hierna zal doorgedaan worden met het vastmaken van het bevestigingspunt met dental cement. Hierbij zal extra zorg worden gedragen dat zowel de lichtvezel als het bevestigingspunt in 1 structuur van dental cement zullen worden opgenomen.

Vorbereiding voor neuronale recordings: Voordat het bevestigingspunt op de schedel zal worden gezet worden er eerst gaten geboord in de schedel (aan de hand van stereotactische coördinaten) om neuronale opnames te kunnen doen. Na het boren van de gaten worden de gaten afgedekt met een kunststof cilinder met een schroefdop of er zullen direct elektrodes in de hersenen geplaatst worden. De cilinder of elektrodes worden vastgezet met tandarts cement. Direct hierna zal doorgedaan worden met het vastmaken van het bevestigingspunt met tandarts cement. Hierbij zal extra zorg worden gedragen dat alle aangebrachte structuren op de schedel in 1 geheel van dental cement zullen worden opgenomen.

Plaatsing van het bevestigingspunt: Het bevestigingspunt wordt vastgemaakt met tandarts cement. De hoofdhuid zal weer worden dichtgemaakt. In de eerste drie dagen na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Na implantatie van het bevestigingspunt krijgt de muis enkele dagen voor herstel. Na het herstel zal de muis getraind worden in de opstelling te zitten. Dit zal worden gedaan door de muis kort te verdoven en

direct vast te maken in de opstelling. De opstelling bestaat uit een balkje waarmee het bevestigingspunt vastgemaakt wordt en een buisje waarin de muis zelf zal zitten tijdens het gedrag. Dit buisje is een belangrijk onderdeel omdat uit ervaring blijkt dat de muizen rustiger zijn als ze het idee hebben gedeeltelijk weggekropen te zitten. De pootjes zullen rusten op een balkje of op de knop. De muis zal vervolgens getraind worden gedurende enkele dagen om rustig te blijven zitten in de opstelling en om een beloning te verdienen door het correct uitvoeren van de taak.

De eerste dagen zal de muis alleen maar wennen aan de opstelling en zal er geen gedrag geëist worden voor een beloning. Na de periode van gewenning zal de muis steeds moeilijkere taakjes krijgen. Dus bijvoorbeeld eerst al beloning na het aanraken van de knop, daarna voor het indrukken van de knop, daarna voor het vasthouden van de knop, etc.

Waterdeprivatie zal gedaan worden in overeenstemming met wat er op andere labs in Nederland, en hier op de afdeling al wordt toegepast. Muizen zullen geen water krijgen in de thuishooi, maar hun water moeten verdienen tijdens de experimentele dagen. Informatie uit andere labs [REDACTED] geeft aan dat muizen per dag 25 μ l/g aan water nodig hebben om een stabiel lichaamsgewicht te behouden (dus 0.625 ml per dag voor een muis van 25g).

Zolang een muis op een waterdeprivatie protocol staat zal de muis dagelijks worden gewogen voor en na de training/ proef. Dit zal vergeleken worden met het weekgemiddelde. Zakt het lichaamsgewicht van de muis onder 90% van dit weekgemiddelde, dan wordt de muis direct van het waterdeprivatie protocol afgehaald en krijgt het ad libitum toegang tot water. Alleen wanneer het lichaamsgewicht van de muis herstelt tot boven het weekgemiddelde zal de muis terug in de proef gezet worden. Ook zal het gewicht van de muis worden gemonitord over langere tijdsperioden om een langzame teruggang in lichaamsgewicht te voorkomen. Wordt zo'n trend signaleerd dan wordt de moeilijkheid van de taak aangepast, of wordt er extra water gegeven na iedere training/ proef.

In toevoeging op het bovenstaande wordt iedere muis in de proef ook dagelijks gecontroleerd op uiterlijke kenmerken en gedrag. Ervaring binnen de universiteit en vanuit externe adviezen geven aan dat wanneer muizen op een dergelijke manier gemonitord worden er geen uitdroging optreedt met verschijnselen zoals ingevallen ogen, afgenomen elasticiteit van de huid en veranderde activiteit. Zodra één of meerdere van deze verschijnselen zich voordoen zal de muis direct uit de proef genomen worden en ad libitum toegang krijgen tot water tot het dier hersteld is. In deze gevallen zal de IvD direct ingelicht worden zodat ook zij het dier kunnen controleren. Alle criteria van monitoring (gewicht voor en na de training/ proef, inname vocht tijdens de training/ proef, algemene uiterlijke kenmerken) worden vastgelegd voor iedere muis zodat de geschiedenis op ieder moment inzichtelijk is.

Optogenetica proef: Nadat de dieren de taak begrijpen zullen we op gezette momenten de pontine kernen inhiberen met een korte lichtpuls. Gedrag tijdens deze lichtpuls trials zullen we analyseren om te onderzoeken welke aspecten van informatie via de pontine kernen worden doorgegeven. De muis wordt zoals normaal vastgezet in de opstelling en de lichtvezel in de muis zal worden vastgemaakt aan de externe lichtbron. Hierdoor kunnen we met een externe lichtbron licht binnen de schedel van de muis brengen en zo de pontine kernen inhiberen. Lichtintensiteit zal nooit zo hoog zijn dat de hersenen opwarmen of dat er schade optreedt door hoge-intensiteit licht. Bovendien is het licht van een relatief lange golflengte (>400 nm) dus er is geen risico op schade zoals bij UV licht. We meten de reactietijden en hoe de knop wordt ingedrukt (kinematics).

Recording proef: Nadat de dieren de taak begrijpen zullen we beginnen met neuronale afleidingen. We zijn geïnteresseerd in de activiteit van neuronen in afferente gebieden en in de activiteit van de neuronen in de pontine kernen tijdens gedrag. Hiervoor willen we meten tijdens stabiel gedrag (einde van leren), maar ook tijdens herleren van de gedragstaak. Dit kunnen we simpel doen door een muis bijvoorbeeld eerst te trainen op een wachttijd van een seconde en vervolgens te hertrainen op een wachttijd van een halve of anderhalve seconde. Wij verwachten dat activiteit tijdens stabiel gedrag anders is dan gedrag tijdens leren. Door zowel de activiteit in afferente gebieden als in de pontine kernen te volgen kunnen we uitzoeken wat precies de transformatie is die in de pontine kernen plaats vindt en welke rol de pontine kernen hebben tijdens gedrag.

Overzicht:

Dag 0:	operatie, implantatie bevestigingspunt.
Minimaal Dag 7:	begin training, vastzitten in opstelling, start water

	restrictie, water aanbieden in opstelling.
Minimaal Dag 9 en in ieder geval twee dagen na begin training:	Training vastzitten in opstelling, water aangeboden in opstelling.
Tot maximaal dag 21:	Training met steeds complexere gedragstaken totdat de complete gedragstaak goed uitgevoerd wordt.
Uiterlijk op dag 22:	Verzameling gedragsdata en elektrofysiologische data. Maximale duur van verzameling gedragsdata en elektrofysiologische data zal 8 dagen bedragen.

Na afloop van de proef moeten we controleren hoe de elektrodes, lichtvezel of virale injecties geplaatst waren. Hiervoor perfuseren we het dier transcardiaal onder diepe anesthesie. Na fixatie worden de hersenen uitgeprepareerd en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor observatie en analyse onder de microscoop.

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

Allereerst om de proef op te zetten gebruiken we een aantal dieren dat iets minder is dan het aantal dieren dat zij gebruikt hebben om de gehele gedragstaak te valideren. We willen immers slechts controleren dat we vergelijkbare uitkomsten krijgen. Vijf dieren zullen genoeg zijn om de opstelling, taak en proef te valideren binnen ons lab.

Voor de optogenetische interventies hebben we gekeken naar de literatuur. In vergelijkbare studies wordt vaak tussen de tien en dertig dieren gebruikt (Zhou *et al.*, 2016; Gunaydin *et al.*, 2014).

Uit dit advies is gebleken dat er ongeveer twintig dieren nodig zijn om statistische verschillen te kunnen detecteren tussen verschillende interventies. De verwachting is dat de optogenetische interventie een extra variantie in de timing van de response aanbrengt van ongeveer 10%. Met een standaard deviatie van 2 milliseconde kunnen we dan met twintig dieren deze verandering detecteren met een power tussen de 70 en 80 procent.

Wat betreft de opnames van neuronale activiteit is in de literatuur het gebruikelijk om op basis van een twintigtal cellen een conclusie te trekken over wat activiteit betekent. Dat betekent dat twintig cellen een statistisch significante modulatie met gedrag laten zien. Die twintig cellen worden dan beoordeeld als representatief voor de populatie van cellen.

B. De dieren

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

Opzetten experimenten:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. Eerder werk wat ik heb gedaan liet zien dat vanaf p30 de schedel volgroeid en stabiel genoeg is om een bevestigingspunt aan vast te maken.

In samenspraak

door gebruik te maken van maximaal vijf dieren. **Totaal aantal dieren: 5 dieren**

Optogenetica:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. Eerder werk wat ik heb gedaan liet zien dat vanaf p30 de schedel volgroeid en stabiel genoeg is om een bevestigingspunt aan vast te maken.

In samenspraak

werd het duidelijk dat we minimaal twintig dieren nodig hebben om verschillen te kunnen opmerken in gedrag. Per dier kunnen we 1 taak testen, dus in totaal hebben we 40 dieren nodig voor het gedrag. De verwachting is dat de optogenetische interventie een extra variantie in de timing van de response aanbrengt van ongeveer 10%. Met een standaard deviatie van 2 milliseconde kunnen we dan met twintig dieren deze verandering detecteren met een power tussen de 70 en 80 procent.

We verwachten dat in een beperkt aantal dieren de lichtvezel en/of de virus injectie niet precies goed

geplaatst zal zijn of dat de dieren de gedragstaak niet (goed) leren. Uit ons overleg met de labs [REDACTED] [REDACTED] verwachten we dit in 25% van de gevallen. Dit betekent dat we 25% extra dieren nodig hebben, dus $40 \times 1.25 = 50$ dieren (40 goed geplaatst, 10 incorrect geplaatst). **Totaal aantal dieren: 50 dieren**

Electrofysiologie:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. [REDACTED]

Om een goed overzicht te krijgen van de activiteit van de neuronen tijdens gedrag moeten we afleiden van minimaal 20 cellen die taak-gerelateerd zijn. Dit aantal is een standaard aantal in de literatuur om een relatie vast te stellen tussen gedrag en neuronale activiteit. Niet in ieder dier zullen we in staat zijn cellen te vinden die taak-gerelateerd zijn. Ervaring leert dat in ongeveer 50% van de experimenten een taak-gerelateerde cel gevonden zal kunnen worden. Ook moet er in twee gebieden gemeten worden, namelijk in de motor cortex en in de pontine kernen. Dit betekent dat we $20 \times 2 \times 2$ cellen moeten meten tijdens gedrag in evenveel dieren. Daarnaast verwachten we dat in een beperkt aantal dieren de elektrodes niet goed geplaatst zullen zijn of dat de muis de gedragstaak niet leert. Op basis van overleg [REDACTED] [REDACTED] verwachten we dat dit in ongeveer 25% van de dieren het geval zal zijn. Dit betekent dus dat we $80 \times 1.25 = 100$ dieren moeten gebruiken voor onze proeven. **Totaal aantal dieren: 100 dieren**

Totaal aantal dieren: 155 muizen

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

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

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen en te overleggen en samen te werken met andere labs in binnen en buitenland. Hierdoor hebben we de beste chirurgische en experimentele technieken in huis kunnen halen.

Verfijning:

Alle onderzoekers op het onderzoek zijn zeer goed getraind in de chirurgische en experimentele technieken. We hebben overlegd met [REDACTED] [REDACTED]. Die informatie van deze bronnen hebben ons overtuigd dat we de experimenten uit kunnen voeren met minimaal ongerief en maximale opbrengst qua data per dier.

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven).

Water deprivatie wordt bij muizen breed toegepast als motivationele cue voor gedragstaken. Water deprivatie heeft nauwelijks nadelige effecten op het welzijn van muizen mits de dieren goed gemonitord worden. Wij hebben in overleg met andere labs in Nederland hun systeem van monitoring overgenomen wat er voor zorgt dat de dieren altijd gezond zullen blijven en dat er direct ingegrepen kan worden mocht het dier toch te veel gewicht verliezen. Door het gebruik van de optogenetica of aan het uitvoeren van recordings verwachten we geen extra ongerief.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. De voorgestelde proeven zijn bedoeld om de gedragstaak op te zetten in ons lab.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke

wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Ear bars worden ingesmeerd met pijnstillende zalf.

De hoofdhuid wordt verdoofd.

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

In de eerste drie dagen na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen. Het gedragstaakje is opgezet en getest [REDACTED] en er zijn geen welzijnsaantastingen opgemerkt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht. Indien een dier niet of slecht herstelt na vijf dagen zal het dier geëuthanaseerd worden.

Tijdens de waterdeprivatie worden de muizen dagelijks gemonitord qua lichaamsgewicht.

Ook worden de muizen gedurende de waterdeprivatie gemonitord op uiterlijke kenmerken. Mocht een dier niet herstellen na water deprivatie, zelfs na terugplaatsing op ad libitum water dan zal er overleg met de IvD plaatsvinden waarbij de IvD de beoordeling van de muis zal doen, waarna besloten kan worden tot Euthanasie.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

K. Classificatie van ongerief

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

Omschrijving	Duur	% dieren	Inschaling
Operatie	1x	100%	Matig
Eerste trainingen met hoofdfixatie	Maximaal 2 uur	100%	Matig
Uitvoeren gedragstaak na training	2 uur per sessie	100%	Licht
Waterdeprivatie	Max 23 dagen	100%	Licht
Doden onder anesthesie	1x, direct	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief:		100%	Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het controleren van de plaatsing van de elektrodes, virusinjectie en lichtvezel is een essentieel onderdeel van deze proef. Dit kan alleen gedaan worden door het dier te doden en de hersenen te analyseren onder de microscoop.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



> 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
AVD112002017828

Bijlagen

2

Datum 19 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 januari 2017. Het gaat om uw project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD112002017828. 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:

19 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017828

Datum:
19 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
19 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 28 februari 2022
Titel project: De pontine kernen in het controleren van bewegingen
Titel niet-technische samenvatting: De Pontine kernen in het controleren van bewegingen
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:

19 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017828

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: [x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: [x] Melding Machtiging
[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 18 januari 2017



> 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
AVD112002017828
Bijlagen
2

Datum 19 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 januari 2017
Vervaldatum: 18 februari 2017
Factuurnummer: 170828

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD112002017828	€ 1.541,00

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 15 februari 2017 9:32
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828

Beste [REDACTED]
De documenten zijn goed ontvangen. De aanvraag wordt vrijdag 17 februari door de CCD besproken,
Groet [REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 14 februari 2017 16:30
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED] Info-zbo
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828

Geachte [REDACTED]
We hebben vandaag de aangepaste NTS en bijlage 2 via de site geüpload. Het gaat hierbij om: AVD_11200 met de naam: format-nts-Pontine kernen_Correctie (AVD112002017828).pdf en bijlage-beschrijving-dierproeven-2Electrofysiologie_Pontine kernen_Correctie (AVD112002017828).pdf
We hopen dat de aanvraag tijdens de eerstvolgende CCD vergadering kan worden besproken.
Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
Secretaris DEC en Ivd VU-VUmc
[REDACTED]



[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 9 februari 2017 11:12
To: Info-zbo; [REDACTED]
Subject: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828
Excuus, het aanvraagnummer moet zijn AVD112002017828,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 11:10
Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD114002017828

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw aanvraag: 'De pontine kernen in het controleren van bewegingen' met aanvraagnummer AVD114002017828.

In bijlage 3.4.4.2 is de berekening van het aantal dieren niet helemaal duidelijk. U beschrijft onder B. de dieren bij 'karakterisatie van convergentie' dat u $n = 5$ dieren per groep nodig heeft, maar komt tot **10** * 6 dieren = 60 dieren. Voor de berekening van 'karakterisatie van enkele inputs' gebruikt u wel de berekening van **5** * 7 dieren. Kunt u de bijlage aanpassen of een aanvulling op de groepsgrootte van 10 dieren geven? Wanneer het aantal dieren niet correct is, moet dat ook in de NTS worden aangepast.

De behandelingsperiode is opgeschort totdat wij uw aanvullingen hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd uw aanvullingen in te sturen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11200
2. Titel van het project:
De pontine kernen in het controleren van bewegingen
3. Titel van de NTS:
De pontine kernen in het controleren van bewegingen
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: *27-10-2016*
 - ☐ aanvraag compleet: *27-10-2016*
 - ☐ in vergadering besproken: *13-12-2016*
 - ☐ 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: *21-12-2016 en 03-01-2017*
 - ☐ advies aan CCD: *18-1-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *27-10-2016*
 - 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: *14-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Tekstuele opmerkingen bij de NTS, in het voorstel zelf meer informatie over met welk onderzoeksgebied de onderzoeker al ervaring heeft. Bij onderdeel 3.4 staan een aantal onderdelen op de verkeerde plaatst weergegeven. In de bijlagen meer informatie geven over de overwegingen, de injectie, de frequenties, de waterdeprivatie en de humane eindpunten.*
- Datum antwoord: *21-12-2016*
- 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.*

Vraagronde 2

- Datum: 02-01-2017
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen, meer informatie over het maximale ongerief, aantallen kloppend maken in alle delen, de overwegingen met betrekking tot de gedragstaak beter weergeven en check nogmaals goed de spelling.*
- Datum antwoord: 03-01-2017
- 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 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 is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. De hypothese is dat de pontine kernen informatie integreren en verwerken van verschillende bronnen, en daarom een essentieel onderdeel is van het hersensysteem dat bewuste bewegingen aanstuurt.*

Men wil de hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen identificeren, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau. Daarnaast gaat men onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronen in de pontine kernen en probeert men vast te stellen wat en hoe de pontine kernen bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen aanstuurt.

Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen. Bewuste bewegingen zijn essentieel voor het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Om bewegingsstoornissen in de toekomst te behandelen moeten eerst de onderliggende oorzaken worden gevonden. Daarvoor is een uitgebreide karakterisatie van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden, die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen, nodig.

De fundamentele kennis is nodig om de werking van de pontine kernen beter te begrijpen, en zal bijdragen aan onderzoek naar de behandeling van bewegingsstoornissen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de werking van de pontine kernen, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen.

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

Proefopzet en haalbaarheid

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

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 samengewerkt met andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

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

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 van bewegingsstoornissen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

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

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

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. 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 uitvoeren van de gedragstaak na training, waterdeprivatie en doden onder anesthesie. Matig ongerief wordt verwacht ten gevolge van de operatie (virus injectie) en eerste trainingen met hoofdfixatie. Het cumulatieve ongerief voor alle dieren is matig. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen.

12. 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, in sommige gevallen waterdeprivatie ondervinden en een gedragstaak moeten uitvoeren.

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

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 <5%.

3V's

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

Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen, hiervoor zijn intacte hersengebieden nodig. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Met dit onderzoek wil men de fundamentele aspecten rondom bewuste beweging onderzoeken bij zoogdieren, als model voor de mens. De muis is het best bestudeerde model op dit onderzoeksgebied. De hersenen van de muis lijken sterk op die van zoogdieren zoals de mens, hierdoor zijn resultaten van dit onderzoek gemakkelijk te vertalen naar toepasbaarheid in de mens. Daarnaast kan men de resultaten in de muis vergelijken met de resultaten van andere (inter)nationale onderzoekslaboratoria.

15. 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. Het aantal dieren is geminimaliseerd door gebruik te maken van een geoptimaliseerde proefopstellingen en door gebruik te maken van de nieuwste technieken.

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 400 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. 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.

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Zowel vrouwtjes als mannetjes zullen worden gebruikt, in gelijke mate.

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

De dieren worden gedood onder anesthesie, om daarna de hersenen verder te kunnen analyseren.

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

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

NTS

21. 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 basale werking van de pontine kernen en daarmee in de toekomst de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen het gebruik van maximaal 400 muizen 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 bewegingsstoornissen.

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 400 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor dit onderzoek is het gebruik van 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 onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over deze pontine kernen en mogelijke behandelingen voor patiënten met bewegingsstoornissen, 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 400 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en indirecte maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de werking van de pontine kernen en zullen indirect bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling van bewegingsstoornissen.

(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 en indirect maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 400 muizen 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



**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
AVD112002017828
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 18 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" met aanvraagnummer AVD112002017828. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd het aantal dieren in bijlage 3.4.4.2 te controleren. U heeft op basis hiervan bijlage dierproeven 3.4.4.2 en de Niet Technische Samenvatting herzien.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

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

U kunt met uw project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 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:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

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 "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" met aanvraagnummer AVD112002017828, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 januari 2017, ontvangen op 19 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Anatomie				
	Muizen (Mus musculus) / Transgeen Synaptophysin-tdTomato muis, en Wild Type	150	100% Matig	
3.4.4.2 Injectie en Slice fysiologie				
	Muizen (Mus musculus) / Wild-type	65	100% Matig	
3.4.4.3 Gedrag				
	Muizen (Mus musculus) / Wild-type	155	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD112002017828

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:

AVD112002017828

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:
AVD112002017828

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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