

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
nr.	document NTS 2017865	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage 1				x	x	x	x		
5	Bijlage 2				x	x	x	x		
6	Bijlage 3				x	x	x	x		
7	Bijlage 4				x	x	x	x		
8	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
9	DEC advies				x	x	x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x	x	x	x		
12	Advies CCD		x							x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x		



13 FEB 2017

1.

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [Redacted] | |
| Afdeling | [Redacted] | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | |
| E-mailadres | instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl | |
- 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 | 10 _ 03 _ 2017 |
| Einddatum | 10 _ 03 _ 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Myelinatieveranderingen in schizofrenie: mechanismen en behandelingen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

<input checked="" type="checkbox"/>	Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.684,00	Lege
<input type="checkbox"/>	Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/>	Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/>	Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/>	Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/>	Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing	
<input type="checkbox"/>	Melding Machtiging
<input checked="" type="checkbox"/>	DEC-advies, factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Nijmegen
Datum	10 - 02/ 2017
Handtekening	[Redacted]

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics |

2 Categories

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

Higher education or training

Forensic enquiries

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics

Schizophrenia

The neuropsychiatric disorder schizophrenia (SZ) has a prevalence of 1% worldwide and is characterized by three different symptom categories: positive symptoms (hallucinations, delusions etc.), negative symptoms (depressive like symptoms including anhedonia and social isolation), and cognitive symptoms (executive functioning deficits, trouble with learning, memory and decision making). Current treatment targets only positive symptoms, hence patients experience a high disease burden and cannot function in daily life. In addition to that, SZ has a high economic cost; treatment expenses, and effects on work and family add up to €93.9 billion per year in Europe (Olesen, Gustavsson et al. 2012). Hence, identifying new treatment strategies targeting cognitive and negative symptoms in SZ is of crucial importance.

Cognitive symptoms in SZ are thought to be caused by dysconnectivity of the prefrontal cortex (WM) caused by white matter (WM) and myelin aberrations in this brain area. This project aims to develop new treatment strategies targeting these abnormalities.

WM and myelination abnormalities in SZ

Diffusion magnetic resonance imaging (dMRI) studies in SZ patients reveal a lower FA in frontal regions, indicating a decrease in WM integrity in this region. This is observed in medicated as well as non-medicated patients (Wang, Deng et al. 2011, Kochunov, Chiappelli et al. 2014, Mighdoll, Tao et al. 2015). Interestingly, a reduced frontal WM integrity can be observed even before SZ disease onset and advances in further stages of the disorder, spreading from frontal towards more caudal and subcortical brain regions.

An important component of WM is the sheath-like, fatty material myelin that surrounds the axons of neurons in the brain and ensures sufficient connectivity. Myelin is produced by oligodendrocytes (OLs), which are derived from oligodendrocyte precursor cells (OPCs), a type of glia cells. This process continues into adulthood (Chang, Nishiyama et al. 2000, Purves 2012).

Studies in SZ *post-mortem* brain tissue show OL as well as myelin deficits in the PFC. In this brain area, lower OL size and density alongside higher levels of OL apoptosis and necrosis have been observed, accompanied by lower levels of myelin (Uranova, Vostrikov et al. 2004, Vostrikov, Uranova et al. 2004, Vostrikov, Orlovskaya et al. 2008). Additionally, there is a regional difference in OL density in the various subdivisions of the PFC in SZ.

The anterior cingulate cortex as well as the dlPFC and mPFC show a significant reduction in the number of OLs, while the paracingulate cortex does not (Hof, Haroutunian et al. 2003, Stark, Uylings et al. 2004). In line with dMRI results, subcortical areas show OL abnormalities as well (Martins-de-Souza, Gattaz et al. 2009). In addition, proteomic analysis of temporal lobe tissue reveals significant differential expression of OL proteins and proteins involved in myelination (Martins-de-Souza, Gattaz et al. 2009). Also, myelin water fraction analysis indicates a 12% lower myelin fraction in SZ patients in the genu of the corpus callosum (close to the PFC). Furthermore, *post-mortem* immunostainings show that myelin associated glycoprotein (MAG) and 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP, OL-related protein) expression are significantly lower in SZ anterior frontal cortex (Flynn, Lang et al. 2003). Additionally, gene expression analysis shows differential expression of myelin-related genes in SZ dlPFC (Hakak, Walker et al. 2001). Overall, the evidence for an OL as well as a myelin deficit in the PFC of SZ *post-mortem* brain tissue is abundant. This suggests that myelination abnormalities form the basis of the WM aberrations found in imaging studies.

Importantly, the decreased FA in SZ frontal regions is directly linked to cognitive symptomatology. Correlations between cognition and frontal WM integrity have been reported in healthy individuals, and several studies have shown that these relationships are disrupted in SZ (Antonius, Prudent et al. 2011, Nazeri, Chakravarty et al. 2013, Caprihan, Jones et al. 2015). For instance, abnormalities in cognitive processing speed are associated with WM disruptions in frontal areas of chronic SZ (Roalf, Ruparel et al. 2013). Also, reduced FA is observed in the inferior fronto-occipital fasciculus in SZ, which correlates with a lower processing speed, and verbal and visual learning deficits (Liu, Lai et al. 2013, Epstein, Cullen et al. 2014). Additionally, genetic predisposition for abnormalities in the SZ-associated microRNA 137 is predictive of lower frontal-striatal FA as well as more severe attention and processing speed abnormalities in SZ (Yap, Teh et al. 2013). In first-episode SZ patients, a lower WM integrity is correlated with more severe cognitive symptoms, amongst others working memory abnormalities (Kuswanto, Teh et al. 2012, Moran, Luscher et al. 2015). Interestingly, cognitive symptomatology worsens as the disease progresses, in line with the WM alterations (Karim, Overshott et al. 2005).



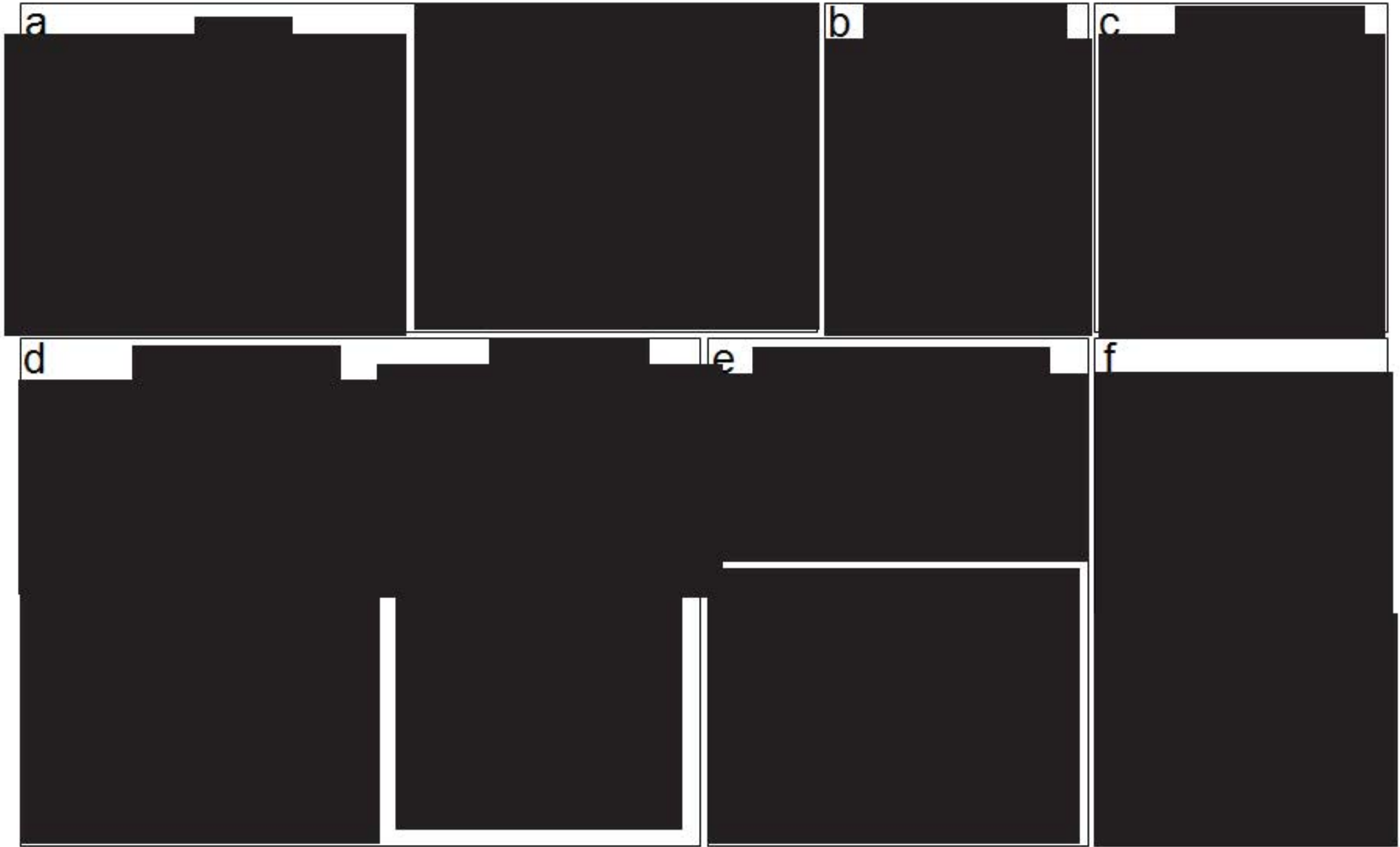
The [redacted] rat model for SZ To study SZ we use the apomorphine susceptible ([redacted]) rats, their control phenotypic counterparts (apomorphine unsusceptible; [redacted]). These rats were generated by a selective breeding system in which Wistar rats with a stereotypical reaction to the dopamine agonist apomorphine (gnawing >500 times in 45 minutes in a gnawing box) were selected and bred as [redacted] rats were selected and bred based on their low response to apomorphine (gnawing <10 times per 45 minutes). The [redacted] rats are the phenotypic counterparts of the [redacted] rats in SZ-like behaviour such as the open field test, the preulse inhibition and latent inhibition tests. Currently we have the 41th generation of [redacted] and [redacted] rats. We have confirmed positive, negative as well as cognitive

symptom-like behaviours in [redacted] rats. In addition to that, the rats show similarities to SZ patients in amongst others neurobiological, endocrinological and genetic domains, and their face and construct validity as a rodent model for SZ is very high, for reviews see (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000).

Myelin and OL-abnormalities in [redacted] rats

We have identified several abnormalities at the level of myelin and OL-abnormalities, and cognition in [redacted] rats that resemble the defects seen in SZ patients. The data we already collected on the myelin- and OL-related abnormalities in [redacted] versus [redacted] rats is shown in Figure 1.





[REDACTED]

Our project

Research addressing the identification and treatment of abnormalities in myelination is of the utmost importance. The fundamental knowledge produced by this research may ultimately open new avenues for a variety of new and/or improved therapeutic strategies for these and other mental disorders where myelin and cognition are affected (e.g. multiple sclerosis). Currently, we have no detailed knowledge of what causes the defects in myelination in SZ. It is also still unknown whether, and to what extent a normalization of myelination could constitute a novel therapeutic approach for cognitive symptoms of SZ. Research in this area will open the possibility to use myelination-related strategies for treatment of SZ, that have until now not been investigated.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Conclusion

Our solid fundamental neurobiological and behavioural research [has](#) strongly increased our current knowledge of the [REDACTED] rat model. In this multidisciplinary project we will build on the many observations we have made using *in vivo* rodent model systems (in particular in [REDACTED] and [REDACTED] rats), patient material, existing datasets and *in vitro* models to further refine our understanding of the role of myelination in SZ, and of the development of myelin-related therapies for cognitive symptoms of SZ. Altogether, this makes it very likely that we can achieve the aims we propose here.

Cited work (in order of appearance)

- J. Olesen, A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen and B. Jonsson: The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*, 19(1), 155-62 (2012) doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03590.
- Wang, W. Deng, C. Huang, M. Li, X. Ma, Y. Wang, L. Jiang, S. Lui, X. Huang, S. E. Chua, C. Cheung, G. M. McAlonan, P. C. Sham, R. M. Murray, D. A. Collier, Q. Gong and T. Li: Abnormalities in connectivity of white-matter tracts in patients with familial and non-familial schizophrenia. *Psychol Med*, 41(8), 1691-700 (2011) doi:10.1017/s0033291710002412
- P. Kochunov, J. Chiappelli, S. N. Wright, L. M. Rowland, B. Patel, S. A. Wijtenburg, K. Nugent, R. P. McMahon, W. T. Carpenter, F. Muellerklein, H. Sampath and L. E. Hong: Multimodal white matter imaging to investigate reduced fractional anisotropy and its age-related decline in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 223(2), 148-56 (2014) doi:10.1016/j.psychres.2014.05.004
- M. I. Mighdoll, R. Tao, J. E. Kleinman and T. M. Hyde: Myelin, myelin-related disorders, and psychosis. *Schizophr Res*, 161(1), 85-93 (2015) doi:10.1016/j.schres.2014.09.040
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- D. Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- N. A. Uranova, V. M. Vostrikov, D. D. Orlovskaya and V. I. Rachmanova: Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-75 (2004) doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- Lauriat, T. L., Shiue, L., Haroutunian, V., Verbitsky, M., Ares, M., Jr., Ospina, L., & McInnes, L. A. (2008). Developmental expression profile of quaking, a candidate gene for schizophrenia, and its target genes in human prefrontal cortex and hippocampus shows regional specificity. *J Neurosci Res*, 86(4), 785-796. doi:10.1002/jnr.21534

3.2 Purpose

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

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

Purpose

The purpose of the project presented here is to understand and treat myelination abnormalities in SZ. More specifically, the key questions we want to address are:

1) What are the molecular, cellular, structural, functional and behavioural characteristics of WM and myelination in the [redacted] rats and their control counterparts?

2) What therapeutic strategies can normalize WM and myelin defects in the PFC and rescue cognitive behavioural abnormalities in the [REDACTED] rat model?

There are several reasons why we think that we will achieve the aims we set here. We are embedded in the lively scientific environment of the Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour. The research at the Donders Institute focuses on neuroscience at various levels, including at the organismal, behavioural, cellular, molecular, genetic, genomics and proteomics levels. The general aim of the institute is to gain insight into brain functioning in health and disease. In relation to studying (human) brain disorders, such as SZ, the Donders Institute provides core facilities for amongst others deep sequencing, transgenesis, histology, fluorescent imaging by confocal and 2-photon technology, mRNA expression profiling, rodent MRI etc. In addition, there is a central animal facility; the dedicated staff at this facility will provide the regular housing of the animals we request here. The dedicated scientists and technicians performing the rodent experiments are very well trained and experienced. In addition, both the animal models we would like to use in this project are already available in our research center, and have been very well characterized. Furthermore, our group consists of highly motivated and skilled senior scientists. We also have strong collaborations with national and international groups. Our research is regularly evaluated within our group and institute meetings and has been positively judged by many different financing organizations including EC, NWO, ZonMW, NIH and several foundations. These organizations use professional, independent external reviewers. Their positive judgments show that our research is of major scientific significance and of the highest quality. The quality of our work is further underscored by the many (inter)national prizes we received for our work and the many peer reviewed publications in the most highly respected scientific journals (e.g. Nature (n=2), Science, Cell, Neuron, Cell Reports, PNAS, J Cell Biology, J Neuroscience; see the reference list below). All these factors combined make it very likely that we, as in the past, will achieve our aims.

Reference list:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]



3.3 Relevance

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

Relevance

Scientific relevance:

This work is expected to provide novel scientific knowledge about the role of WM and myelination in SZ; (1) the multi-level characterization, (2) the identification of novel treatment strategies for cognitive symptoms of SZ will be investigated. This is of great importance as in SZ current treatment only targets positive symptoms; not negative and in particular cognitive symptoms. This represents a gap in our scientific knowledge of SZ with an urgent need to be investigated.

This fundamental knowledge might, upon proof of principle in our model system(s), ultimately facilitate the development of novel and/or improved human therapies designed to achieve a better quality of life for MD and SZ patients. Importantly, the project we present here will allow us to look at new strategies to enhance myelination. Myelination defects are found in many other diseases like multiple sclerosis, autism, Parkinson's disease and Alzheimer. The treatment strategies we will develop in this project will therefore be renewing not only in the fields of MD and SZ research but can also benefit other research areas.

In addition, we will investigate the relationship between WM and myelin alterations and behaviour. Research in this area is evolving, and knowledge about the influence of myelination on behaviour is limited. Therefore our findings could be of major influence in this field.

Moreover, the research described in this application is funded by a Top Talent grant provided by the Donders Institute for Brain Cognition and Behaviour. This indicates the novelty, potential and feasibility of the project.

Societal relevance:


Brain disorders are associated with substantial burden for the patients and enormous costs for society. Indeed, the economic cost of diseases is becoming an increasingly important parameter for health and research policies. Research leads to discovery of mechanisms that are of equal importance to neuropsychiatric and neurological disorders (Olesen, Baker et al. 2006). World Health Organization (WHO) data indicate that, together, these disorders account for one-third of the burden of all diseases in the wealthy part of the world (Olesen and Leonardi 2003). The total annual cost figure of brain disorders, 798 billion Euros, makes it apparent that these disorders are the biggest health challenge of the century, posing a serious threat to our social and health care systems as well as to the future of European economy (Olesen, Gustavsson et al. 2012). Furthermore, the prevalence and cost of brain disorders are going to increase because of increasing life expectancy. In particular, the number of patients with neuropsychiatric disorders will increase. Increased focus on research strategies, prevention, and care is therefore necessary to reduce the future cost of brain disorders. Animal models of neuropsychiatric disorders are essential for the assessment of new therapeutic options. Here we focus on mechanisms and therapeutics regarding myelination abnormalities in SZ, on the one hand because of their associated burden for the patient and society, and on the other hand because of our research track record and funding.

We would also like to highlight the fact that the disorder we will investigate in this project, SZ, has insufficient treatment. This causes the disease burden for patients and their families to be very high. In SZ current treatment only targets positive, and not negative and cognitive symptoms (see above). It is therefore of the utmost importance that research concerning better and more effective treatment strategies is conducted, and this is of both high scientific and societal relevance. Our investigation will look at highly novel treatment strategies and therefore has the potential to, ultimately, enhance the treatment possibilities for SZ patients.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Research strategy

Our research strategy is 

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cited work (in order of appearance)

- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychresns.2014.10.017
- F. Carletti, J. B. Woolley, S. Bhattacharyya, R. Perez-Iglesias, P. Fusar Poli, L. Valmaggia, M. R. Broome, E. Bramon, L. Johns, V. Giampietro, S. C. Williams, G. J. Barker and P. K. McGuire: Alterations in white matter evident before the onset of psychosis. *Schizophr Bull*, 38(6), 1170-9 (2012) doi:10.1093/schbul/sbs053
- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019

- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- .Najm FJ, Madhavan M, Zaremba A, Shick E, Karl RT, Factor DC, Miller TE, Nevin ZS, Kantor C, Sargent A, Quick KL, Schlatzer DM, Tang H, Papoian R, Brimacombe KR, Shen M, Boxer MB, Jadhav A, Robinson AP, Podojil JR, Miller SD, Miller RH, Tesar PJ. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo *Nature*. 2015 Jun 11;522(7555):216-20. doi: 10.1038/nature14335. Epub 2015 Apr 20.
- Li Z, He Y, Fan S, Sun B. Clemastine rescues behavioral changes and enhances remyelination in the cuprizone mouse model of demyelination. *Neurosci Bull*. 2015 Oct;31(5):617-25. doi: 10.1007/s12264-015-1555-3. Epub 2015 Aug 6.
- Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, Padmanabhan K, Swoboda JG, Ahmad I, Kondo T, Gage FH, Theofilopoulos AN, Lawson BR, Schultz PG, Lairson LL. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):327-32. doi: 10.1038/nature12647. Epub 2013 Oct 9
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Baron-Van Evercooren A, Chambon P, Ffrench-Constant C, Franklin RJ. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2011 Jan;14(1):45-53. doi: 10.1038/nn.2702. Epub 2010 Dec 5.
- Monin A, Baumann PS, Griffa A, Xin L, Mekle R, Fournier M, Buttica C, Klaey M, Cabungcal JH, Steullet P, Ferrari C, Cuenod M, Gruetter R, Thiran JP, Hagmann P, Conus P, Do KQ. Glutathione deficit impairs myelin maturation: relevance for white matter integrity in schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 2015 Jul;20(7):827-38. doi: 10.1038/mp.2014.88. Epub 2014 Aug 26.
- Choy KH1, Dean O, Berk M, Bush AI, van den Buuse M. Effects of N-acetyl-cysteine treatment on glutathione depletion and a short-term spatial memory deficit in 2-cyclohexene-1-one-treated rats. *Eur J Pharmacol*. 2010 Dec 15;649(1-3):224-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.035. Epub 2010 Sep 22.
- Kessler A, Biasibetti M, Feksa LR, Rech VC, Melo DA, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM. Effects of cysteamine on oxidative status in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis*. 2008 Mar;23(1):81-93. Epub 2007 Nov 21.
- Pae CU1, Lee C, Paik IH. Therapeutic possibilities of cysteamine in the treatment of schizophrenia. *Med Hypotheses*. 2007;69(1):199-202. Epub 2006 Dec 12.
- D. Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- L. E. Rivers, K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson: PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*, 11(12), 1392-401 (2008) doi:10.1038/nn.2220
- S. L. Bengtsson, Z. Nagy, S. Skare, L. Forsman, H. Forsberg and F. Ullén: Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci*, 8(9), 1148-50 (2005) doi:10.1038/nn1516
- S. Mensch, M. Baraban, R. Almeida, T. Czopka, J. Ausborn, A. El Manira and D. A. Lyons: Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat Neurosci* (2015) doi:10.1038/nn.3991
- E. M. Gibson, D. Purger, C. W. Mount, A. K. Goldstein, G. L. Lin, L. S. Wood, I. Inema, S. E. Miller, G. Bieri, J. B. Zuchero, B. A. Barres, P. J.

Woo, H. Vogel and M. Monje: Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304 (2014) doi:10.1126/science.1252304

- J. Liu, K. Dietz, J. M. DeLoyht, X. Pedre, D. Kelkar, J. Kaur, V. Vialou, M. K. Lobo, D. M. Dietz, E. J. Nestler, J. Dupree and P. Casaccia: Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-3 (2012) doi:10.1038/nn.3263
- M. Makinodan, K. M. Rosen, S. Ito and G. Corfas: A Critical Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6100), 1357-1360 (2012) doi:10.1126/science.1220845
- Tomlinson L, Leiton CV, Colognato H. Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*. 2015 Sep 28. pii: S0028-3908(15)30108-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.016.

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

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

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

Coherence

All experiments requested in this application are centred around a common topic: WM and myelin abnormalities in SZ. The relationship between WM, myelination and disease-related behaviours is largely unknown. An attractive part of our research constitutes the combination of the various characterization approaches in Level 1. We will be able to elucidate the specific myelination deficits at different states, with the combination of

molecular and cellular techniques. Furthermore, we will be able to link these cellular/molecular results to the WM structure observed with MRI. This makes the research approach not only very strong, but also more easily translatable to the human situation. There is a substantial amount of literature about WM structure in the brains of SZ patients, and by applying the same imaging approach in our rat model we will be able not only to compare the results, but also to combine these results with molecular and cellular data. In addition, in MD and SZ patients MRI experiments are often combined with cognitive tests to see the correlation between brain structure and activation and cognitive performance. With the project presented here we will be able to apply the same approach in our rat models, and to elaborate on the changes in WM structure by looking closely at myelination at the molecular and cellular levels. This way we will elucidate exactly the relationship between disease-related behaviours, WM and myelination.

Level 2: manipulation adds another dimension to this project. We will be able to investigate pharmacological as well as cognitive behavioural approaches for the treatment of WM and myelination abnormalities and their related disease-specific behaviours. This greatly increases the relevance of the project, because ultimately it could lead to new treatment strategies, and as such increase the quality of life for SZ patients.

The animal model we will use is well suited for this particular project. The [redacted] and [redacted] rats are a unique rat model for SZ. Unlike other animal models, these rats show a high face as well as construct validity for all symptom categories of SZ, as previously described (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000). [redacted]

[redacted] In addition, the rats show similarities with SZ patients in amongst others neurobiological, endocrinological and genetic domains; for reviews see (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000). [redacted]

[redacted] Hence, this rat model for SZ is ideal for this project concerning WM and myelination abnormalities in SZ.

Cited work

- B. A. Ellenbroek, M. A. Geyer and A. R. Cools: The behavior of [redacted] rats in animal models with construct validity for schizophrenia. *J Neurosci*, 15(11), 7604-11 (1995)
- B. Ellenbroek and A. Cools: Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural pharmacology*, 11(3/4), 223-234 (2000)

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Characterization: Molecular / Cellular / Structural
2	Characterization: Behaviour
3	Pharmacological manipulation
4	Behavioural manipulation

**Appendix
Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="616 798 795 821">Serial number</th> <th data-bbox="1355 798 2083 821">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="616 829 795 952">1</td> <td data-bbox="1355 829 2083 952">Characterization: Molecular / Cellular / Structural</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Characterization: Molecular / Cellular / Structural
Serial number	Type of animal procedure					
1	Characterization: Molecular / Cellular / Structural					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

1. Experimental approach and primary outcome parameters

The experimental approach will consist of the decapitation of animals without anaesthesia, or by perfusion of animals with 1-4% PFA or 1-4% PFA with 0.5-2% GA under anaesthesia. Afterwards, brains will be removed immediately and frozen on dry ice (-80°C)/isopentane (-60°C) or placed in 1-4% PFA/GA at 4°C.

We will study several primary outcome parameters that, combined, allow us to characterize myelination:

- lipidomic state

- [REDACTED] (a project in collaboration with prof. [REDACTED])

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED] (a collaboration with [REDACTED])

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

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

2. Animal procedures

Animal procedures will consist of direct decapitation without anaesthesia, or of intracardiac perfusion with 1-4% PFA or 1-4% PFA with 0.5-2% GA under terminal anaesthesia (overdose pentobarbital, i.p.). Decapitation without anaesthesia is necessary for the gene, protein, metabolomics and lipidomics studies, given that anaesthesia has been shown to affect these measurements. Killing using perfusion is necessary for the brains to retain an optimal tissue structure, for characterization by immunohistochemistry, electron microscopy MRI or third harmonics generation imaging.

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

3. Statistical methods

The proposed control groups of [REDACTED] rats are necessary; data cannot be appropriately interpreted without knowledge about baseline myelination characteristics.

Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype for most of the experiments.

For the [REDACTED] experiments we will use n=15. A high number of animals is required because the data collected in [REDACTED] experiments consists of the expression level of [REDACTED] in the tissue. To find subtle differences in the expression of a specific [REDACTED] and to be able to apply multiple comparisons corrections we will need a high n. In the past our group has successfully performed [REDACTED] experiments with an n of 10. Therefore we will use n=10 for the [REDACTED]. For the electron microscopy the n=6 will be applied and for the electrophysiology experiments we will use n=6/group as described before [REDACTED]. For [REDACTED] imaging group sizes of n=13-18 have been applied with success in our group and hence we ask for n=15/group for these experiments [REDACTED]).

Cited work

- Luoni, A., Hulsken, S., Cazzaniga, G., Racagni, G., Homberg, J. R., & Riva, M. A. (2013). Behavioural and neuroplastic properties of chronic lurasidone treatment in serotonin transporter knockout rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(6), 1319-1330. doi:10.1017/s1461145712001332
- van der Marel, K., Bouet, V., Meerhoff, G. F., Freret, T., Boulouard, M., Dauphin, F., . . . Reneman, L. (2015). Effects of long-term methylphenidate treatment in adolescent and adult rats on hippocampal shape, functional connectivity and adult neurogenesis. *Neuroscience*, 309, 243-258. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.044
- Selten, M. M., Meyer, F., Ba, W., Valles, A., Maas, D. A., Negwer, M., . . . Martens, G. J. (2016). Increased GABAB receptor signaling in a rat model for schizophrenia. *Sci Rep*, 6, 34240. doi:10.1038/srep34240
- van der Marel, K., Homberg, J. R., Otte, W. M., & Dijkhuizen, R. M. (2013). Functional and Structural Neural Network Characterization of Serotonin Transporter Knockout Rats. *PLoS One*, 8(2), e57780. doi:10.1371/journal.pone.0057780

B. The animals

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

1. Choice and justification animals

We use the apomorphine-susceptible ([REDACTED]) rats and their controls ([REDACTED]) to model SZ-like characteristics. [REDACTED] rat lines are bred by our group at the Nijmegen Central Animal Facility.

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved in schizophrenia-related pathology. The components we are investigating are cognition and myelination. It is known that cognitive symptoms are more severe in male than in female SZ patients (Kao et al., 2013; Leger & Neill, 2016). Therefore mixing of sexes in one group will diminish our chances of finding relevant differences in cognition. In addition there is a sex difference in mRNA expression in the PFC of SZ patients (Qin et al., 2016). In animal models of SZ differences in the number of myelinated axons have been found between male and female rats and the level of demyelination in a demyelination model is different between the sexes (Valeiras et al., 2014; Wischhof et al., 2015). [REDACTED]

[REDACTED]. Hence, mixing the sexes in one group while looking at myelin and oligodendrocytes could lead to a smaller change of identifying relevant differences. Therefore we will only include male rats in our experiments.

Figure 2. [REDACTED]



Naive rats in three age groups will be studied: childhood, adolescence, adulthood. This serves the purpose of looking at the development of WM and myelination within all critical periods in the development of SZ. [REDACTED] outcome parameter is the exception, for this technique only **rats of 1-2 days old** are needed.

So we will use 15 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 3 = 180$ rats are needed.

So we will use 10 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $10 \times 2 \times 1 \times 2 \times 3 = 120$ rats are needed.

So we will use 6 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $6 \times 2 \times 1 \times 3 \times 3 = 108$ rats are needed.

For [REDACTED] we will need 15 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 1 outcome measure, and 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 1 \times 1 = 30$ rats are needed.

Unfortunately, it is not possible to combine multiple outcome measures within 1 animal, because every one of these analyses needs a different way of processing of the brain tissue, that are not compatible with each other. In addition, the mPFC area that is affected in [REDACTED] rats is a very small brain area. When the brain is bisected into two hemispheres this area gets cut in half. The remaining tissue on both sides is slightly different because

the cut is never exactly in the middle of the brain, in addition there is not enough tissue left to extract for example RNA from. [REDACTED]

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/ycp.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- Kao, Y. C., Liu, Y. P., Lien, Y. J., Lin, S. J., Lu, C. W., Wang, T. S., & Loh, C. H. (2013). The influence of sex on cognitive insight and neurocognitive functioning in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 44, 193-200. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.02.006
- Leger, M., & Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 979-1000.
- Qin, W., Liu, C., Sodhi, M., & Lu, H. (2016). Meta-analysis of sex differences in gene expression in schizophrenia. *BMC Syst Biol*, 10 Suppl 1, 9. doi:10.1186/s12918-015-0250-3
- Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reines, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, 62(10), 1629-1644. doi:10.1002/glia.22704
- Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia-- differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57, 17-30. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.10.004

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Childhood
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Adolescence
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Adulthood
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Childhood
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Adolescence
Rat [REDACTED]	Own breeding	68	Adulthood
Rat [REDACTED]	Own breeding	15	Embryonal
Rat [REDACTED]	Own breeding	15	Embryonal

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The rat is the best nonprimate animal model to study human psychiatric disorders. Because of the biological as well as phenotypic complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. The use of cell models, or other alternatives without the use of animals, is not an option because the myelin abnormalities in SZ are very complex, and hence need to be studied in the context of the brain.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects on neurobiological mechanisms. We choose our outcome parameters specifically to look at myelination, we did not include any outcome measures that are not absolutely necessary to draw a solid conclusion considering the myelination state of the rats. In addition we did an elaborate literature review to make sure we are aware of experiments that have already been done and we only ask for experiments here that are relevant to our research field. Also, we thought about combining several outcome parameters within the same animals although unfortunately this is not possible within the experiments described here.

Refinement: The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrificing. Only experienced researchers will sacrifice the animals and the procedures are done as fast as possible to minimize stress for the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during the sacrifice of the animals, only experienced researchers will perform the procedures. The procedures will be performed in a separate room as fast as possible such that the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition, rats will be socially housed with cage enrichment.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The only adverse effect on the welfare of the animals will be the killing. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Because the decapitation without anaesthesia will be done by an experienced experimenter and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation. Before perfusion, anaesthesia will be used and this procedure will also be conducted by an experienced researcher to minimize discomfort. The [REDACTED] rat model itself includes a mild discomfort because of weaning at PND28.

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

Because the decapitation without anaesthesia will be done by an experienced experimenter and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation. Before perfusion, anaesthesia will be used and this procedure will also be conducted by an experienced researcher to minimize discomfort. The [REDACTED] rat model itself includes a mild discomfort because of weaning at PND28.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

All animals will experience mild discomfort levels during the experiment. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort as well.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

We need the brains of the rats to assess WM and myelination abnormalities.

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

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

Yes

**Appendix
Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Characterization: Behaviour

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

1. Experimental approach and primary outcome parameters

Animals will be subjected to several behavioural tests. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA with or without 0.5-2% GA under anaesthesia.

Cognitive behavioural characterization:

Behavioural characterization will be performed in 2 groups of animals with the following tests for cognition and affection:

- Group 1.1: [REDACTED]

- Group 1.2: [REDACTED]

Behavioural characterization of cognitive phenotypes in [REDACTED] rats. [REDACTED]
[REDACTED] Therefore we would like to perform behavioural tests that rely on mPFC functioning as well as tests that represent a cognitive defect seen in SZ patients. [REDACTED]

All of these tests represent cognitive behaviour in humans that is aberrant in SZ, and therefore they are relevant to perform in our animal model and its controls. Different behavioural tests are combined within one animal as much as possible. Unfortunately, behaviour in the [REDACTED] test can be influenced by previous experience of the rats, therefore we have to perform it in a separate group of animals.

Outcome measures:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

5. Reversal learning: right light + left lever is rewarded



Cited work (in order of appearance)

- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017
- F. Carletti, J. B. Woolley, S. Bhattacharyya, R. Perez-Iglesias, P. Fusar Poli, L. Valmaggia, M. R. Broome, E. Bramon, L. Johns, V. Giampietro, S. C. Williams, G. J. Barker and P. K. McGuire: Alterations in white matter evident before the onset of psychosis. *Schizophr Bull*, 38(6), 1170-9 (2012) doi:10.1093/schbul/sbs053
- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032 N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.

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

2. Animal procedures

Animals will be subjected to several behavioural tests. After the last behavioural experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA with or without 0.5-2% GA under anaesthesia.

Duration is as follows:

Group 1: Behavioural characterization

[REDACTED]

- Group 1.2: Set-shifting (2 hours per day for 6 weeks)

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVA's. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype. We have minimized the number of groups by using one group of animals for multiple behavioural tests. However, the effect of performing [REDACTED] on the performance in the [REDACTED] is unknown, therefore we will also do this test in a separate group of animals. In addition, because the [REDACTED] test is a relatively long paradigm, behaviour of the rats in other tests could be influenced by the training they received in the [REDACTED] test. Therefore we need two separate groups of rats to do these test.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible [REDACTED] rats and their appropriate controls [REDACTED] to model SZ-like characteristics. The [REDACTED] rat lines [REDACTED]

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in the behavioural measures we apply (Granger et al., 2016,

Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015).

Behavioural characterization will be performed in adulthood (PND60 onwards). So for behavioural characterization we will need: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 4 experimental groups (2 activity control groups;) 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 4 \times 1 = 120$ rats.

The activity control groups are necessary because the activity the rats undergo in the tests could have an impact on the brain. After the behavioural testing we want to look at the myelin characteristics to be able to correlate them to the behaviour of the rats. To do this in a correct manner we will need to control for activity.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/ycp.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568
- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Own breeding	60	adulthood
Rat	Own breeding	60	adulthood

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals to characterize behaviour in multiple tests. In addition we did an elaborate literature review to make sure we are aware of experiments that have already been done and we only ask for experiments here that are relevant to our research field.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed to behavioural tests that might be stressful. This is necessary and cannot be avoided. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals and the procedures are done as fast as possible to minimize stress for the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during the behavioural tests and the sacrifice of the animals, only experienced researchers will perform the procedures. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible such that the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition, rats will be socially housed with cage enrichment. During experiments the rats will be handled by experienced researchers to minimize stress and the rats' wellbeing will be checked daily.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

n.a.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. Finally, since rats like sucrose a lot, this will be used as reward in the tests that require a food reward; delayed alternation, radial arm maze and set-shifting tests are expected to be a pleasurable activity for the animals for this reason.

The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers will be used.

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

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed and have cage enrichment.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience the incidence of a humane endpoint in the procedures as they are described here is very low, <2%.

K. Classification of severity of procedures

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

During behavioural testing rats will experience mild stress. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort as well.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Brains of the rats will be studied.

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

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

| Yes

Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Pharmacological manipulation

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

1. Experimental approach and primary outcome parameters

[REDACTED]. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA (with or without 0.5-2% GA) under anaesthesia. Choice of sacrificing depends on whether level 1 experiments reveal molecular or cellular readouts to be the most reliable to judge the effect of the treatment on myelination.

Group 1: Pharmacological manipulation

Application of pharmacological compound followed by behavioural or molecular/cellular/structural characterization.

- Group 1.1: Application of pharmacological compound; molecular/cellular characterization
- Group 1.2: Application of vehicle; molecular/cellular characterization

In group 1.1 and 1.2 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [REDACTED] and [REDACTED]. This way we can reduce the number of animals significantly. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measure should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a drug to treat myelin abnormalities.

GO/NO GO point: If in group 1.1 and 1.2 the pharmacological treatment is effective, groups 1.3-1.6 will be added. Otherwise, we will terminate the experiments of this DAP.

We will perform a dose-response pilot experiment to ensure successful drug testing in the rats. In these pilot studies up to 3 different doses of the drug will be tested in small groups of animals (n=6/group).

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

Unfortunately, it is not possible to combine the several vehicle groups. To ensure a reliable control group rats of the vehicle groups will have to be treated and sacrificed at the same time and in the same environment as the rats receiving the pharmacological treatment. It is unrealistic to propose to do more than two groups of rats at the same time considering timelines and workload, therefore we propose the proper vehicle group for every pharmacologically treated group.

We would like to test [REDACTED] Until this day optimal doses of these drugs to target myelination in the rat are unknown, therefore doing these dose-response curves will be necessary. However, if in the mean time literature emerges that shows effectiveness of one of the drugs on myelination level in the rat we will adapt the dose used there and skip the pilot experiment to reduce the number of animals used.

Outcome measures:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task., *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.
- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017

-
-
-

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

2. Animal procedures

Animals will be exposed to a pharmacological manipulation followed by behavioural characterization. Duration is as follows.

Pharmacological compounds will be administered either via intraperitoneal/subcutaneous injections or via the food/water supply 1 or 2 times daily for a minimum of 7 and a maximum of 21 days. Followed by:

- Groups 1.1-1.2: direct sacrifice 24hr-10 days after the last injection. The variable time of sacrifice has to do with the different mechanisms of action of the drugs, for example: the myelination process is not immediate, influences on this system need time to exert their effects.

If a compound is effective in group 1.1 and 1.2, groups 1.3-1.6 will be added.

- Group 1.3 and 1.4:

[REDACTED]

The choice of these tests depends on the results of DAP2. We will choose the behavioural tests that show the largest differences in behaviour between [REDACTED] and [REDACTED] rats. If all tests show differences we will do all, if two of them show differences we will only perform those two, if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test.

- Group 1.5 and 1.6: [REDACTED] (2 hours per day for 6 weeks).

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVAs, using rat line and manipulation as between subjects factor. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible (██████████) rats and their appropriate controls (██████████) to model SZ-like characteristics. The ██████████ rat lines are bred by our group at the Nijmegen animal facility.

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in measures we apply (Granger et al., 2016, Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015). ██████████

Pharmacological manipulation with ██████████ Dose-response curve establishment will have to be examined in pilot experiments. To this end we will use 6 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 doses, **2 life stages: 6 x 2 x 1 x 3 x 2 = 72 animals**. We significantly reduce the number of animals used here by only asking for 1 sex and **2 lifestages**. This should be enough to establish a dose-response curve.

Pharmacological manipulation with ██████████ will be performed at two ages. The first age is between PND7 and PND90. This mimics the preadolescent and adolescent periods, in this way we can investigate the preventative use of drugs. The second age is during adulthood to investigate the use of drugs to treat myelination deficits. **It is important to do a dose-response curve establishment in both age groups, because the effective dose of the drug can differ at different ages (Echeverria et al., 1975, d'Hollander et al., 1982).**

So for pharmacological manipulation we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 8 experimental groups (6 experimental groups plus 2 extra activity control groups for the behavioural tests), 2 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 8 \times 2 = 480$ rats. (In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 2 experimental groups, 2 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 2 = 120$ rats)

We will target ██████████, so we will need **4 x 72 = 288** rats for dose response curves plus $4 \times 480 = 1920$ rats for pharmacological manipulation in a GO situation (and $4 \times 120 = 480$ rats in a NO GO situation).

Pharmacological manipulation with antioxidants

Dose-response curve establishment will have to be examined in pilot experiments. To this end we will use 6 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 doses, 1 life stage: $6 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 36$ animals. We significantly reduce the number of animals used here by only asking for 1 sex and 1 lifestage. This should be enough to establish a dose-response curve, **and in this case we use only 1 life stage because we would like to test ██████████ at only one age (see below).**

██████████ we would like to test at only one age: from PND28 (weaning) onwards, to test their preventative use. So for pharmacological manipulation with antioxidants we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 8 experimental groups (6 experimental groups plus 2 extra activity control groups for the behavioural tests), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 8 \times 1 = 240$ rats. (In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 2 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 1 = 60$ rats)

Our motivation to test [REDACTED]

There are 2 [REDACTED] that we would like to test, so we will need $2 \times 36 = 72$ animals for dose response establishment and $2 \times 240 = 480$ rats for pharmacological manipulations in a GO situation (and $2 \times 60 = 120$ rats in a NO GO situation).

For a detailed description of every drug that we would like to test, please see 'research strategy' in the project proposal

We would like to test 2 different drugs [REDACTED] 2 compounds targeting [REDACTED] and 2 [REDACTED]. Until this day optimal doses of these drugs to target myelination in the rat are unknown, therefore doing these dose-response curves will be necessary. However, if in the mean time literature emerges that shows effectiveness of one of the drugs on myelination level in the rat we will adapt the dose used there and skip the pilot experiment to reduce the number of animals used.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/yco.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568

- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044
- Echeverria P, Siber GR, Paisley J, Smith AL, Smith DH, Jaffe N, et al. Age-dependent dose response to gentamicin. *The Journal of pediatrics* 1975; 87(5): 805-808
- d'Hollander A, Massaux F, Nevelsteen M, Agoston S. Age-dependent dose-response relationship of ORG NC 45 in anaesthetized patients. *British journal of anaesthesia* 1982; 54(6): 653-657.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
[REDACTED]	own breeding	552	(pre-)adolescence
	own breeding	552	(pre-)adolescence
	own breeding	552	adulthood
	own breeding	552	adulthood
	own breeding	276	young
	own breeding	276	young

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals for different behavioural characterizations after the manipulation. In addition we reduce animals by using only one group of animals for molecular characterization and only one group for cellular characterization after pharmacological manipulation. We could have chosen to look at all molecular/cellular/structural determinants of myelination that we look at in DAP1, but we decided to reduce the number of animals that 2 of these measures that prove most reliable in DAP1 will have to suffice. In addition we use only 1 activity control group for both the [REDACTED] instead of one group per test. Also, the pharmacological manipulation or vehicle followed by [REDACTED] g will only be performed when [REDACTED] proves significantly different between [REDACTED] and [REDACTED] rats in DAP2 experiments.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed behavioural tests. This can be stressful. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed and have cage enrichment. During pharmacological manipulation and behavioural testing rats will be handled, this helps to reduce the stress and pain of injections.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Injections during the pharmacological manipulations can be painful. However, these injections will only hurt the rat for a second, therefore pain relief will not be necessary. Moreover, the rats will be handled by the researcher doing the injections. This helps to reduce the pain, because the rats get used to the experimenter and are relaxed while receiving the injection this reduces injection pain significantly.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Drug administration is associated with mild pain. Rats are handled very well by the researcher doing the injection, this helps the rat to relax and reduces injection pain significantly. It could be that the medications themselves have adverse effects on the well being of the rats. Rats will hence be checked daily for these effects. In addition, the rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. Some of the tests involve food rewards that will be given in the form of sucrose pellets, rats like sucrose a lot, and therefore these tests are a pleasurable activity for the animals. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress and injections that might be painful. The medications might also have negative effects on the wellbeing of the rats. Finally, since rats like sucrose a lot, the sucrose consumption and latent inhibition tests are expected to be a pleasurable activity for the animals.

The rats will receive treatment and be exposed to behavioural tests. The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers will be used.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, which contributes to stress reduction. The rats will also only be handled by experienced researchers, and by the same researchers throughout the experiments. This way the rats get used to being picked up, which is necessary for placing the rats in the test apparatus and giving the rats injections. Handling reduces stress a lot.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.
Extra humane endpoints will be applied for the effects of the medications and the injections: severe skin wounds, weight loss (> 15%), immobility, poor coat conditions and loss of function of any body parts.

Indicate the likely incidence.

<2% this percentage is based on our extensive experience.

K. Classification of severity of procedures

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

During the pharmacological manipulation and the behavioural tests rats will experience mild stress. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

We need the rat brains to analyse the effects.

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

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

Yes

**Appendix
Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300					
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen					
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="604 798 1344 829">Serial number</th> <th data-bbox="1344 798 2083 829">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="604 829 1344 952">4</td> <td data-bbox="1344 829 2083 952">Behavioural manipulation</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Behavioural manipulation	
Serial number	Type of animal procedure						
4	Behavioural manipulation						

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

1. Experimental approach and primary outcome parameters

Animals will be subjected to a behavioural manipulation with the goal to normalize myelin abnormalities and behaviour. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA (with or without 0.5-2% GA) under anaesthesia. The behavioural manipulations will aim to rescue myelin and behavioural abnormalities. In the [REDACTED] rats we have seen, as mentioned above, that in specifically the prefrontal cortex the myelination-related mRNA's are downregulated. The behavioural manipulations we chose aim to rescue this. Myelination is not a rigid process, but a rather plastic event. The plasticity in the formation and retraction of myelin sheaths by OLs occurs from early childhood into adulthood (Chang, Nishiyama et al. 2000, Rivers, Young et al. 2008, Purves 2012). For instance, learning to play piano leads to an increase in WM density in certain areas of the motor cortex and neuronal activity increases myelin sheath production (Bengtsson, Nagy et al. 2005, Mensch, Baraban et al. 2015). Neuronal activity can instruct OPCs to divide and mature, and eventually leads to increases in myelination associated with improved behavioural performance (Gibson, Purger et al. 2014). In a rodent model of prolonged social isolation, myelination is impaired and myelin-related gene expression reduced. This normalized when social isolation was ended (Liu, Dietz et al. 2012). Additionally, when social isolation occurs in a critical period for myelin development in the PFC, the resulting hypomyelination cannot be reversed (Makinodan, Rosen et al. 2012). Interestingly, an enriched environment has been shown to have a positive effect on both myelination and cognition (Tomlinson et al., 2015). This means that behavioural tasks could promote myelination via neural activation and social interaction, while the opposite is also true.

[REDACTED] If we find a positive effect of [REDACTED] on myelination, this may have implications for the development of new behavioural therapies in SZ.

The other behavioural manipulation we would like to perform is the [REDACTED]

[REDACTED] The rats learn to perform an interesting test in which hippocampus and prefrontal cortex activation are required.

[REDACTED] This manipulation will give us the opportunity to see the effect of training brain circuits on the myelination of these circuits. This would provide a scientific groundwork for the development of cognitive behavioural therapies that target specific brain circuits and could be very helpful for the future treatment of SZ.

Group 1: Behavioural manipulation by the [REDACTED]

Behavioural manipulation 1 will consist of the [REDACTED] This will be followed by either behavioural or molecular/cellular characterization.

- Group 1.1: [REDACTED]; molecular characterization
- Group 1.2: activity control group; molecular characterization

· Group 1.3 molecular characterization (no manipulation control group, we cannot use animals from DAP1 here because the rats need to be sacrificed at the same time in the same setting to make a reliable comparison and we would like to be able to perform the DAP1 experiments before this experiment to choose the molecular outcome parameter that shows the largest [redacted] versus [redacted] difference)

GO/NO GO point: If the groups 1.1-1.3 reveal that the [redacted] test is effective in inducing myelination we will also use groups 1.4-1.6

· Group 1.4: [redacted] and behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if set-shifting shows the largest differences we will only use set-shifting.

· Group 1.5: Activity control group and behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] the largest differences we will only use [redacted].

· Group 1.6: behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted]. The behavioural tests to be used will be the ones that shows the largest difference in cognitive ability of [redacted] versus [redacted] rats in DAP2. A maximum of two behavioural tests will be used, these tests will be the most effective ones. If [redacted] is shows the largest differences we will perform only [redacted].

In group 1.1-1.3 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [redacted] and [redacted] rats. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measures should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a behavioural therapy to treat myelin abnormalities.

Group 2: Behavioural manipulation by [redacted]

Behavioural manipulation 2 will consist of an [redacted] paradigm.

This will be followed by either behavioural or molecular/cellular characterization

· Group 2.1: [redacted]; molecular characterization

· Group 2.2: [redacted]; molecular characterization

· Group 2.3: [redacted]; molecular characterization (no manipulation control group, this group cannot be substituted with a group from DAP1 because the rats have to be sacrificed at the same time and in the same setting to provide a reliable control group)

GO/NO GO point: If the groups 2.1-2.3 reveal that the [redacted] paradigm test is effective in inducing myelination we will also use groups 2.4-2.6

· Group 2.4: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

· Group 2.5: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

· Group 2.6: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests *that show the largest cognitive deficit* in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

(no manipulation control group, this group cannot be substituted with a group from DAP1 because the rats have to be sacrificed at the same time and in the same setting to provide a reliable control group)

The behavioural tests to be used will be the ones *that shows the largest difference* in cognitive ability of [redacted] versus [redacted] rats in DAP2. A maximum of two behavioural tests will be used, these tests will be the most effective ones. If [redacted] is shows the largest differences we will perform only [redacted].

In group 2.1-2.3 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [redacted] and [redacted] rats. This way we can reduce the number of animals significantly. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measures should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a behavioural therapy to treat myelin abnormalities.

Outcome measures:

Behavioural manipulations:

[redacted]

Outcome measures behavioural tests and molecular/cellular characterization:

[redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



Cited work (in order of appearance)

- Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- L. E. Rivers, K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson: PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*, 11(12), 1392-401 (2008) doi:10.1038/nn.2220
- S. L. Bengtsson, Z. Nagy, S. Skare, L. Forsman, H. Forssberg and F. Ullen: Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci*, 8(9), 1148-50 (2005) doi:10.1038/nn1516
- S. Mensch, M. Baraban, R. Almeida, T. Czopka, J. Ausborn, A. El Manira and D. A. Lyons: Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat Neurosci* (2015) doi:10.1038/nn.3991
- E. M. Gibson, D. Purger, C. W. Mount, A. K. Goldstein, G. L. Lin, L. S. Wood, I. Inema, S. E. Miller, G. Bieri, J. B. Zuchero, B. A. Barres, P. J. Woo, H. Vogel and M. Monje: Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304 (2014) doi:10.1126/science.1252304
- 70. J. Liu, K. Dietz, J. M. DeLoyht, X. Pedre, D. Kelkar, J. Kaur, V. Vialou, M. K. Lobo, D. M. Dietz, E. J. Nestler, J. Dupree and P. Casaccia: Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-3 (2012) doi:10.1038/nn.3263

- Tomlinson L, Leiton CV, Colognato H. Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*. 2015 Sep 28. pii: S0028-3908(15)30108-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.016.
- J. C. Talpos, N. Aerts, L. Fellini and T. Steckler: A touch-screen based paired-associates learning (PAL) task for the rat may provide a translatable pharmacological model of human cognitive impairment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 122, 97-106 (2014) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.014>
- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017

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

2. Animal procedures

Animals will be exposed to either the [REDACTED], or [REDACTED] followed by behavioural characterization. Duration is as follows.

Either [REDACTED] (2 hours per day for 3 weeks) or [REDACTED] (paradigm will be applied with a maximum duration of 2 months) followed by:

- Groups 1.1-1.3 and 2.1-2.3: decapitation 24 hours after the end of the paradigm or up to 7 days later to allow for the changes to the myelin to be made.

Groups 1.4-1.6 and 2.4-2.6 will only be used when in groups 1.1-1.3 and 2.1-2.3 effectiveness of the treatment has been found.

- Group 1.4-1.6 and 2.4-2.6: behavioural tests (see DAP2 for times, up to two tests will be performed or only [REDACTED] will be performed depending on DAP2 results) and decapitation.

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVAs, using rat line and manipulation as between subjects factor. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype. We have minimized the number of groups by using one group of animals for molecular/cellular characterization, instead of a control group in every manipulation experiment.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible [REDACTED] rats and their appropriate controls ([REDACTED]) to model SZ-like characteristics. The [REDACTED]

[REDACTED] S rat lines [REDACTED]

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in measures we apply (Granger et al., 2016, Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015). [REDACTED], hence we will

only perform our experiments in male rats.

[REDACTED] will be performed only during adulthood.

So for [REDACTED] we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 7 experimental groups (6 experimental groups plus 1 activity control groups for the behavioural tests), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 7 \times 1 = 210$ rats.

In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 90$ rats.

[REDACTED] will be performed from PND28 (weaning) onwards because it concerns housing conditions.

So for [REDACTED] we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 7 experimental groups (6 experimental groups plus 1 activity control groups for the behavioural test), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 7 \times 1 = 210$ rats. **In a NO GO situation we will only use:** 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 90$ rats.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/yco.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568
- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat [REDACTED]	Own breeding	105	adulthood
Rat [REDACTED]	Own breeding	105	adulthood

Rat [REDACTED]	Own breeding	105	PND28
Rat [REDACTED]	Own breeding	105	PND28

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals for different behavioural characterizations after the manipulation. In addition we reduce animals by using only one group of animals for molecular characterization after manipulations. We could have chosen to look at all molecular/cellular/structural determinants of myelination that we look at in DAP1, but we decided to reduce the number of animals so that 2 of these measures that prove most reliable in DAP1 will have to suffice. Also, the [REDACTED] with their respective control groups followed by behavioural testing will only be performed when these paradigms are proven successful at inducing myelination.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed to behavioural tests. This can be stressful. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals.

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

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed ([REDACTED]) and have cage enrichment. In addition rats will be handled during [REDACTED] and during the behavioural tests, this helps reducing the stress during the experiments. In addition, the same researchers will be involved in one experiment, that way the rats can get used to the experimenter which reduces stress.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

G. Location where the animals procedures are performed

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. In addition the rats will be handled by the researchers that do the experiment, which reduces stress. [REDACTED]
[REDACTED], this is a pleasurable activity for the rats. [REDACTED]
might cause stress. In addition, the rats that will do the [REDACTED] paradigm will be food deprived for a short period right before the test, this can be stressful for the rats. However, during the test they can earn food rewards, and after testing they will have ad libitum access to food. Also their

weight will be measured daily to ensure that they do not lose weight. In addition, as sucrose is used as a reward this is pleasurable for the rats. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. Since rats like sucrose a lot, the [REDACTED] paradigm is expected to be a pleasurable activity for the animals. However, the small timeperiod of food deprivation right before the [REDACTED] test could be stressful for the animals. Also in the [REDACTED] rats are socially housed in large cages and have access to more than the standard enrichment, this is very pleasurable activity for the rats. During [REDACTED] rats can experience stress because they are housed alone.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, this reduces stress. [REDACTED] this will be a nice experience for the rats. [REDACTED], which might be stressful. However, during testing the rats will be handled by the researchers to reduce stress. In addition, only experienced researchers will work with the animals. The rats that will do the [REDACTED] paradigm will be food deprived for a short period right before the test, this can be stressful for the rats. However, during the test they can earn food rewards, and after testing they will have ad libitum access to food. We will measure their weight daily, and when severe weight loss occurs we will shorten the time period of food deprivation before testing.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

<2% this number is based on our extensive experience in animal research

K. Classification of severity of procedures

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

During the [REDACTED] and behavioural testing **350 rats (83.33 % of all rats in this DAP)** will experience mild stress . During [REDACTED] **70 rats (16.66 % of all rats in this DAP)** will experience moderate stress levels due to the long time period of social isolation. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

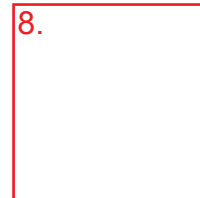
Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We need the rat brains to analyse the effects.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002017865

Bijlagen

2

Datum 10 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 februari 2017. Het gaat om uw project "Myelination in schizofrenia: mechanisms and therapeutics". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017865. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

10 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017865

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
10 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

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: 10 maart 2017
Geplande einddatum: 10 maart 2022
Titel project: Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics
Titel niet-technische samenvatting: Myelinatieveranderingen in schizofrenie: mechanismen en behandelingen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 februari 2017

Datum:
10 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Groteplein 10

Postbus Postbus 9101, [redacted]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002017865

Bijlagen

2

Datum 10 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 februari 2017

Vervaldatum: 12 maart 2017

Factuurnummer: 170865

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 [redacted]

projectnummer: 2015-0125 Verantwoordelijk onderzoeker: [redacted]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017865	€ 1.684,00

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



[Redacted text]

Daarom is het nu van belang te onderzoeken wat het effect van interventies op de myeline niveaus in de PFC en op het gedrag van [Redacted] ratten is. Dit onderzoek zou gevolgen kunnen hebben voor nieuwe behandlungsstrategieën in SZ, juist omdat het ziekte beeld in de PFC van patiënten zo goed over overeenkomt met wat wij zien in ons model. DAP1 is slechts bedoeld als aanvullend onderzoek naar de mechanismen die ten grondslag liggen aan de myelinatie defecten. Om deze redenen zouden wij graag onze DEC indienen met alle 4 de DAPs.

-3.2 Er wordt een aantal argumenten aangedragen waaruit de haalbaarheid van het project zou moeten blijken. De commissie adviseert enkele key publications te noemen die deze argumenten ondersteunen.
Antwoord: Publicaties zijn toegevoegd aan de tekst onder 3.2 in de projectaanvraag.

-3.4.1 De karakterisatie van niveau 1 is al erg omvangrijk: uit de beschrijving van DADP1 blijkt dat er 9 primaire uitkomstparameters onderzocht zullen worden om de myelinisatie van de prefrontale cortex te karakteriseren. De commissie vermoedt dat deze uitgebreide karakterisatie, nog exclusief de gedragstesten, al enkele jaren in beslag zal nemen. Zij vraagt zich daarom af of al het in deze projectaanvraag beschreven onderzoek wel in 5 jaar uitgevoerd kan worden.

Antwoord: De meeste technieken die wij noemen in DAP1 zijn al opgezet in ons lab of doen wij in samenwerking met andere laboratoria waar de expertise en materialen aanwezig zijn om de technieken uit te voeren. Bijvoorbeeld, de mRNA- en eiwitexpressie van myeline-gerelateerde componenten worden routinematig uitgevoerd in ons lab. Dit geldt ook voor de [Redacted]. Deze zijn opgezet en uitvoerbaar op korte termijn. De [Redacted] worden gedaan in samenwerking met de groep van [Redacted]. Zij hebben de expertise en zullen deze experimenten voor ons uitvoeren. Daarbij hebben wij een directe samenwerking met het lab van [Redacted]. Zijn groep is gespecialiseerd in electronen microscopie voor de visualisatie van myeline en in electrofysiologie van OPCs. Met behulp van de expertise die aanwezig is in ons lab en de samenwerking met andere specialisten zijn de experimenten beschreven in DAP1 realistisch en haalbaar binnen de voorgestelde termijn. Om het aantal dieren te verminderen en de haalbaarheid te verbeteren is de groep 'metabolic state' weggelaten.

-B: De benodigde groepsgrootte is geschat op basis van eerder werk en wordt op 15 gesteld voor elk van de te onderzoeken parameters. De commissie verzoekt de onderzoekers voor elk van de uitkomstparameters aan te geven hoe deze n=15 tot stand is gekomen, eventueel met verwijzing naar eerder gepubliceerd werk. Een dergelijke groepsgrootte lijkt voor een aantal uitkomstmaten (zoals bijv. imaging, EM) vrij excessief.

Antwoord: Voor [REDACTED] heeft onze groep n=12-15 gebruikt ([REDACTED]). Daarbij is de groepsgrootte bij [REDACTED] geschat op n=13-18 in eerdere experimenten waarin verschillen werden gevonden ([REDACTED]). Voor [REDACTED] verminderen wij het aantal naar n=6. Voor immunohistochemie is een n van 10 minimale groeps grootte en daarom verminderen wij deze experimenten naar n=10 zoals in eerdere publicaties van onze groep ([REDACTED]). Hetzelfde geldt voor de [REDACTED] experimenten. De experimenten waarin wij naar de [REDACTED] status van het weefsel kijken is een hoge n nodig om verschillen in bepaalde/specifieke [REDACTED] te kunnen onderscheiden en multiple testing correcties te kunnen toepassen. Zodanig houden wij n=15 per groep aan voor deze experimenten. Voor electrofysiologie in [REDACTED] ratten is n=4-6 gebruikt, daarom verminderen wij de groepen voor [REDACTED] naar n=6 per groep ([REDACTED]).

Niet-technische samenvatting:

Het taalgebruik is af en toe wel erg gepopulariseerd ('vettig goedje', 'leuke activiteit'). De commissie verzoekt u dit anders te formuleren.

Antwoord: Het taalgebruik is nu aangepast.

De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Verdere veranderingen zijn aangebracht in de aantallen beschreven in de NTS.

Referenties

- Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (2002). Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav Genet*, 32(5), 349-361.
- Ellenbroek, B. A., Geyer, M. A., & Cools, A. R. (1995). The behavior of [REDACTED] rats in animal models with construct validity for schizophrenia. *J Neurosci*, 15(11), 7604-7611.
- Flynn, S. W., Lang, D. J., Mackay, A. L., Goghari, V., Vavasour, I. M., Whittall, K. P., . . . Honer, W. G. (2003). Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry*, 8(9), 811-820. doi:10.1038/sj.mp.4001337
- Hakak, Y., Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., . . . Fienberg, A. A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4746-4751. doi:10.1073/pnas.081071198
- Hof, P. R., Haroutunian, V., Friedrich, V. L., Jr., Byne, W., Buitron, C., Perl, D. P., & Davis, K. L. (2003). Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1075-1085.
- Kao, Y. C., Liu, Y. P., Lien, Y. J., Lin, S. J., Lu, C. W., Wang, T. S., & Loh, C. H. (2013). The influence of sex on cognitive insight and neurocognitive functioning in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 44, 193-200. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.02.006
- Lauriat, T. L., Shiue, L., Haroutunian, V., Verbitsky, M., Ares, M., Jr., Ospina, L., & McInnes, L. A. (2008). Developmental expression profile of quaking, a candidate gene for schizophrenia, and its target genes in human prefrontal cortex and hippocampus shows regional specificity. *J Neurosci Res*, 86(4), 785-796. doi:10.1002/jnr.21534
- Leger, M., & Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 979-1000. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.06.029

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Mauney, S. A., Pietersen, C. Y., Sonntag, K. C., & Woo, T. U. (2015). Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*, 169(1-3), 374-380. doi:10.1016/j.schres.2015.10.042

Qin, W., Liu, C., Sodhi, M., & Lu, H. (2016). Meta-analysis of sex differences in gene expression in schizophrenia. *BMC Syst Biol*, 10 Suppl 1, 9. doi:10.1186/s12918-015-0250-3

Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigo, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888.

Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6

Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reines, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, 62(10), 1629-1644. doi:10.1002/glia.22704

Vostrikov, V. M., Uranova, N. A., Rakhmanova, V. I., & Orlovskaya, D. D. (2004). [Lowered oligodendroglial cell density in the prefrontal cortex in schizophrenia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 104(1), 47-51.

Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia--differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57, 17-30. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.10.004

- Datum: 14-12-2016
- Datum antwoorden: 20-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

De commissie heeft de onderzoekers gevraagd om te laten zien dat myelinisatie van de prefrontale cortex van [redacted] ratten afwijkt van de myelinisatie van dit hersengebied in normale Wistar ratten. De onderzoekers antwoorden dat de [redacted] rat een betere controle is dan de gewone Wistar rat omdat de [redacted] Wistar rat (waaruit de [redacted] rat is ontstaan) niet meer bestaat. Het verbaast de commissie dan ook dat de onderzoekers toch van plan zijn om alle experimenten niet alleen in [redacted] en [redacted] ratten maar ook in Wistar ratten (welke eigen fok bedoelen de onderzoekers?) uit te voeren. Dit ofschoon daar volgens hen dan geen duidelijke rationale voor zou bestaan. Volgens de commissie is de Wistar rat echter zeker zo'n goede controle als de [redacted] rat, want als er een (causaal) verband bestaat tussen het myeline defect en schizofreen gedrag dan zal ook deze rat geen myeline defect vertonen. De commissie vindt deze dubbele controle dan ook zo zinvol dat ze bij haar verzoek blijft om de aanvraag in eerste instantie te beperken tot DAP1.

De commissie acht de uitkomsten van DAP1 noodzakelijk om een ethische afweging te kunnen maken over de vervolgentexperimenten.

Antwoord: De commissie vraagt ons de aanvraag te beperken tot DAP1 en eerst eenzelfde verschil in myelinatie te laten zien tussen [redacted] en Wistar ratten als al is geobserveerd in [redacted] ratten. Wij zijn inderdaad van mening dat de [redacted] rat een betere controle is dan de Wistar rat in experimenten waarin de [redacted] rat wordt gebruikt; al 30 jaar is de combinatie steeds geweest [redacted] met als controle [redacted]. Het ligt daarom niet direct voor de hand om Wistar ratten mee te nemen in dit onderzoek. De initiële rationale voor het meenemen van Wistar ratten in deze aanvraag was da , hoewel

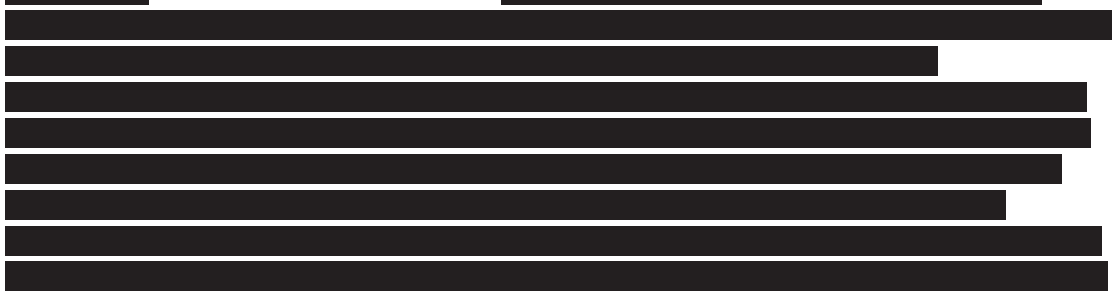
onwaarschijnlijk gezien de in het verleden gepubliceerde artikelen over ██████████ het mogelijk is dat als wij een artikel indienen voor publicatie, reviewers vragen naar de myelinatie status van Wistar ratten. Door het includeren van Wistar ratten in deze aanvraag zouden wij gemakkelijk dit soort experimenten kunnen toevoegen, mocht dit nodig zijn. Echter, zoals wij eerder al hebben aangegeven, is vanuit wetenschappelijk oogpunt de ██████████ rat een betere controle voor de ██████████ rat dan de Wistar rat (zie ook beneden). Er is dan ook geen directe noodzaak en rationale voor het meenemen van Wistar ratten in deze aanvraag; daarom hebben wij er nu voor gekozen deze weg te laten.

De ██████████ ratten zijn een betere controle voor de ██████████ ratten dan Wistar ratten omdat:

1. De ██████████ Wistar rat, waarvan de ██████████ lijnen zijn afgeleid, niet meer bestaat.
2. Wij houden tijdens onze fok van de ██████████ lijnen de genetische- en omgevingsfactoren altijd gelijk binnen onze populaties. Deze factoren zijn in Wistar ratten echter niet gelijk. Bovendien, in oudere maar ook in recente literatuur (die peer review heeft ondergaan voor publicatie) kunt u terug vinden dat als controle voor de ██████████ rat de ██████████ rat wordt gebruikt, en niet de Wistar rat (Selten et al., 2016; van Vugt et al., 2014). Het is ook belangrijk om te noemen dat omgevingsfactoren een grote invloed hebben op de myelinatie van het brein, en dat bij het vergelijken van de myelinatie tussen verschillende dieren de omgevingsfactoren zoveel mogelijk gelijk gehouden moeten worden (Liu et al., 2012; Makinodan, Rosen, Ito, & Corfas, 2012).
3. Wij zouden Wistar ratten moeten bestellen bij een bedrijf, en dan zullen deze dieren dus transport/omgevingsstress ervaren die ██████████ ratten niet ervaren. Dit soort ervaringen hebben invloed op de myelinatie van het brein en zal dus een belangrijke confounder zijn in het onderzoek (Tomlinson, Leiton, & Colognato, 2016).

Daarnaast wijzen wij graag op het feit dat het doen van de experimenten met ██████████ en Wistar ratten ertoe zou leiden dat wij nieuwe groepen ratten moeten offeren. Om op moleculair/cellulair niveau dieren te kunnen vergelijken moeten zij in dezelfde omgeving op hetzelfde tijdstip geofferd worden. Dat betekent dus dat wij opnieuw ██████████ ratten moeten offeren om dezelfde experimenten mee uit te voeren die wij al hebben gedaan met de ██████████. Dit betekent het gebruik van veel extra dieren, terwijl dit, wetenschappelijk gezien, niet absoluut noodzakelijk is.

Als laatste zouden wij graag willen noemen dat het doel van deze aanvraag is het uitvoeren van onderzoek naar nieuwe behandelingsstrategieën voor het myelinedefect in schizofrenie. Wij hebben reeds veel data verzameld over het ██████████ in onze ██████████ ratten versus ██████████ ratten. Figuur 1 laat zien dat ██████████



██████████ De verschillen die wij observeren zijn direct vergelijkbaar met de verschillen die zijn gevonden in post-mortem breinweefsel van schizofreniepatiënten versus controles: ██████████

[Redacted text block]



Figuur 1. [Redacted text block]



Figuur 2. [REDACTED]

Onze uitgebreide karakterisatie van het [REDACTED] in de [REDACTED] rat die zo goed overeenkomt met wat er wordt gevonden in schizofreniepatiënten heeft ertoe geleid dat wij deze DEC aanvraag hebben geschreven. De volgende stap in dit onderzoek is namelijk het ontwikkelen van een behandelingsstrategie om het myeline-defect te kunnen verhelpen, zodat in de toekomst nieuwe therapieën voor schizofreniepatiënten ontwikkeld kunnen worden.

Wij passen de aanvraag als volgt aan met het doel alleen dieren te gebruiken die absoluut noodzakelijk zijn en een zo hoog mogelijke wetenschappelijk belang te bereiken:

- o Wistar ratten worden in de gehele aanvraag achterwege gelaten.
- o DAP1 omvat alleen experimenten die wij nog niet in [REDACTED] hebben uitgevoerd en die ons iets kunnen vertellen over de mechanistische achtergrond van het myelinedefect.
- o DAP2 omvat een batterij aan gedragsexperimenten waarin wij PFC-afhankelijk gedrag

- testen. Op deze manier kunnen wij het myelinedefect koppelen aan een gedragsdefect.
- o DAP3 omvat farmacologische interventies: hier proberen wij met [REDACTED]. GO/NO GO punt: eventueel herhalen wij na interventie de gedragstest uit DAP2 die het grootste verschil laat zien, echter alleen als er een verschil geobserveerd is in DAP2.
 - o DAP4 omvat gedragsinterventies: hier proberen wij het [REDACTED]. GO/NO GO punt: eventueel herhalen wij na interventie de gedragstest uit DAP2 die het grootste verschil laat zien, echter alleen als er een verschil geobserveerd is in DAP2.

Description of Animal Procedures:

-De myelinisatiegraad verschilt per corticale laag. Uit de antwoorden van de onderzoekers blijkt dat zij de myelinisatie van alle lagen samen zullen analyseren, omdat er geen aanwijzingen zijn dat de veranderingen in myeline verschillen per laag. Zijn er dan wel aanwijzingen dat deze veranderingen hetzelfde zijn in alle lagen? Wanneer deze verschillen er in de praktijk toch blijken te zijn (ondanks dat er nog geen aanwijzingen voor zijn), dan zouden deze onopgemerkt kunnen blijven omdat alle lagen tezamen worden geanalyseerd. *Antwoord: Wij zullen de myeline in de corticale lagen apart analyseren om zo zeker te weten dat er geen verschillen onopgemerkt blijven.*

-De onderzoekers geven aan dat de gezochte veranderingen in myelinisatie en gedrag waarschijnlijk sterker zullen zijn in mannelijke ratten. De commissie verzoekt u het onderzoek met alleen mannelijke dieren uit te voeren indien u geen gebruik wilt maken van gemengde groepen. Het feit dat er vrouwelijke dieren voorhanden zijn is geen goed argument om er proeven mee te doen, omdat het ongerief voor deze dieren toeneemt wanneer zij aan het experiment worden toegevoegd. *Antwoord: Wij zijn het met de commissie eens en zullen het onderzoek alleen in mannelijke ratten uitvoeren.*

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS. *Antwoord: De NTS is aangepast.*

Referenties

- Flynn, S. W., Lang, D. J., Mackay, A. L., Goghari, V., Vavasour, I. M., Whittall, K. P., . . . Honer, W. G. (2003). Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry*, 8(9), 811-820. doi:10.1038/sj.mp.4001337
- Hakak, Y., Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., . . . Fienberg, A. A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4746-4751. doi:10.1073/pnas.081071198
- Hof, P. R., Haroutunian, V., Friedrich, V. L., Jr., Byne, W., Buitron, C., Perl, D. P., & Davis, K. L. (2003). Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1075-1085.
- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J., . . . Casaccia, P. (2012). Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-1623. doi:10.1038/nn.3263
- Makinodan, M., Rosen, K. M., Ito, S., & Corfas, G. (2012). A Critical Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. *Science*, 337(6100), 1357-1360. doi:10.1126/science.1220845
- Mauney, S. A., Pietersen, C. Y., Sonntag, K. C., & Woo, T. U. (2015). Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*, 169(1-3), 374-380. doi:10.1016/j.schres.2015.10.042
- Selten, M. M., Meyer, F., Ba, W., Valles, A., Maas, D. A., Negwer, M., . . . Martens, G. J. (2016). Increased GABAB receptor signaling in a rat model for schizophrenia. *Sci Rep*, 6, 34240. doi:10.1038/srep34240

- Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888.
- Tomlinson, L., Leiton, C. V., & Colognato, H. (2016). Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*, 110(Pt B), 548-562. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.016
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- van Vugt, R. W., Meyer, F., van Hulten, J. A., Vernooij, J., Cools, A. R., Verheij, M. M., & Martens, G. J. (2014). Maternal care affects the phenotype of a rat model for schizophrenia. *Front Behav Neurosci*, 8, 268. doi:10.3389/fnbeh.2014.00268
- Vostrikov, V. M., Uranova, N. A., Rakhmanova, V. I., & Orlovskaya, D. D. (2004). [Lowered oligodendroglial cell density in the prefrontal cortex in schizophrenia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 104(1), 47-51.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. Uit bovenstaande correspondentie met de aanvrager blijkt dat dit uitgebreid getoetst is. 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.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het gedetailleerd in kaart brengen van de [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van therapieën die de cognitieve problemen (op het gebied van executief functioneren, leren, geheugen en besluitvorming) van schizofrenie patiënten verminderen. Het vermoeden bestaat dat de afname van witte stof in bepaalde hersengebieden van schizofrenie patiënten de cognitieve symptomen van deze ziekte veroorzaakt. Deze hypothese wordt door de aanvrager onderzocht op moleculair, cellulair en gedragsmatig niveau in een specifiek ratmodel voor deze ziekte. De resultaten van dit onderzoek kunnen leiden tot nieuwe therapie-mogelijkheden voor mensen met schizofrenie waardoor hun problemen op cognitief gebied zouden kunnen afnemen. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. Bovendien is de DEC van mening dat het doel van deze projectaanvraag gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals schizofrenie, is van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd.
12. De integriteit van de dieren wordt enigszins aangetast door de selectieve fok. Op basis van de reactie op het toedienen van de dopamine agonist apomorfine worden dieren geselecteerd voor deze fok die er op gericht is ratten te verkrijgen die als model voor schizofrenie dienen. De zelfredzaamheid van deze dieren is hierdoor echter niet merkbaar aangetast.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met de gebruikte rattenstammen ingeschat. De commissie is het dan ook eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Myelinisatie en de effecten daarvan op het gedrag kunnen alleen in proefdieren worden onderzocht. De invloed van middelen en van huisvestingsomstandigheden op die myelinisatie (en daarmee op het gedrag), kan alleen in hersenen van proefdieren worden onderzocht.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk worden meerdere gedragstesten met hetzelfde dier uitgevoerd. Alle controlegroepen zijn nodig om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De gekozen gedragstesten veroorzaken doorgaans niet meer dan licht ongerief. De langdurige individuele huisvesting van een deel van de dieren veroorzaakt matig ongerief, maar is noodzakelijk voor het behalen van de doelstelling. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager wil het onderzoek alleen bij mannelijke dieren uitvoeren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Het is bekend dat cognitieve symptomen sterker zijn in mannelijke dan in vrouwelijke schizofreniepatiënten. De verschillen in myelinisatie in het gehanteerde diermodel voor schizofrenie zijn ook groter in mannelijke dieren dan in vrouwelijke dieren. Daarom zullen de experimenten alleen met mannelijke dieren worden gedaan. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om hersenweefsel te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een lichte tot matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Schizofrenie is een ingrijpende ziekte die in 1% van de wereldwijde populatie optreedt. De huidige behandeling richt zich alleen op het verminderen van de zogenaamde positieve symptomen (zoals hallucinaties), terwijl ook de cognitieve symptomen (aantasting van het cognitief functioneren, moeite met leren, herinneren en beslissen) bijdragen aan de hoge ziektelast en een grote impact hebben op de zelfredzaamheid van de patiënt. De resultaten van dit project kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën die de cognitieve symptomen van schizofrenie verminderen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe aanvullende therapieën voor schizofrenie van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het gedetailleerd in kaart brengen van de afwijkingen in de myelinisatie van de prefrontale cortex in een ratmodel voor schizofrenie, en onderzoeken of herstel van de myelinisatie leidt tot normalisatie van de resultaten van cognitieve gedragstesten met deze dieren. Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van

therapieën die de cognitieve problemen (op het gebied van executief functioneren, leren, geheugen en besluitvorming) van schizofrenie patiënten verminderen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002017865

Datum 2 maart 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 10 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat er embryo's worden verzameld. Op welk moment in de dracht worden deze verzameld? Pas vanaf het derde trimester van de dracht (dag E14) hoeven de dieren opgenomen te worden in het projectvoorstel.

Op bladzijde 27 van de DAP, bijlage 3.4.4.3 beschrijft u in de eerste alinea bij de farmacologische interventies dat u voor de pilots om een dose response curve te maken slechts 1 sex en 1 leeftijd gebruikt. Uit de berekening van het aantal dieren die er net voorstaat rekent u wel met 2 leeftijden en komt u op n=72 ratten. Dit lijkt met elkaar in tegenspraak.

Bij de pilot voor het maken van een dose response curve voor interventie met antioxidanten komt u wel op n=36 dieren voor de pilot.

Kunt u in bijlage 3.4.4.4 bij K. de ongeriefclassificatie de dieren uitsplitsen

naar aantal en percentage dieren dat Licht dan wel Matig ongerief zal ondervinden?

Wanneer er dieraantallen of ongeriefclassificatie wijzigen naar aanleiding van uw aanvullingen, kunt u dan ook de Niet technische Samenvatting aanpassen?

Datum:
2 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Antwoorden ivm aanvraag projectvergunning Dierproeven getiteld "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" (aanvraagnummer AVD103002017865)

In de nieuwe versie van onze projectaanvraag zijn veranderingen in het groen aangegeven. Hieronder kunt u de antwoorden vinden op alle vragen die aan ons gesteld zijn.

Onduidelijkheden:

- “In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat er embryo's worden verzameld. Op welk moment in de dracht worden deze verzameld? Pas vanaf het derde trimester van de dracht (dag E14) hoeven de dieren opgenomen te worden in het projectvoorstel.”

Antwoord: Recentelijke testen met het verzamelen van primaire cultures van oligodendrocyten hebben aangetoond dat dit celtype nog niet aanwezig is in de embryonale fase, maar pas rond de geboorte van de dieren wordt gevormd. Daarom passen wij dit aan naar dieren van 1-2 dagen oud. Zie voor textuele veranderingen DAP1; choice and justification of animals.

- “Op bladzijde 27 van de DAP, bijlage 3.4.4.3 beschrijft u in de eerste alinea bij de farmacologische interventies dat u voor de pilots om een dose response curve te maken slechts 1 sex en 1 leeftijd gebruikt. Uit de berekening van het aantal dieren die er net voorstaat rekent u wel met 2 leeftijden en komt u op n=72 ratten. Dit lijkt met elkaar in tegenspraak. Bij de pilot voor het maken van een dose response curve voor interventie met antioxidanten komt u wel op n=36 dieren voor de pilot.”

Antwoord: De farmacologische interventie met [REDACTED] zullen wij doen op 2 verschillende leeftijden, omdat leeftijd de effectieve dosis van een stof kan beïnvloeden (Echeverria, Siber et al. 1975, d'Hollander, Massaux et al. 1982). Daarom zou een dose-response curve die gemaakt is met gebruik van jonge dieren, niet toepasbaar zijn op experimenten die met volwassen dieren worden gedaan en omgekeerd. Daarom willen wij voor de [REDACTED] stoffen graag op 2 leeftijden een dose-response curve maken, zodat wij op beide leeftijden de effectieve dosis kunnen bepalen en een optimaal experiment kunnen uitvoeren.

De farmacologische interventie met [REDACTED] willen wij doen op dieren van 1 leeftijdscategorie, omdat het gebruik van [REDACTED] alleen een preventief effect zou kunnen hebben. Het testen van de effectieve dosis hoeft daarom ook alleen op de leeftijd gedaan te worden, waarop wij de experimenten willen uitvoeren. In dit geval is dat dus slechts 1 leeftijd en daarom willen wij graag een dose-response curve met dieren van 1 leeftijd maken voor de interventie met [REDACTED].

Dit is nu verduidelijkt in de aanvraag, deze veranderingen kunnen worden gevonden in DAP3; choice and justification of animals.

- “Kunt u in bijlage 3.4.4.4 bij K. de ongeriefclassificatie de dieren uitsplitsen naar aantal en percentage dieren dat Licht dan wel Matig ongerief zal ondervinden?”

Antwoord: Dit is nu aangepast in de aanvraag; veranderingen kunnen worden gevonden in sectie K van DAP4.

- “Wanneer er dieraantallen of ongeriefclassificatie wijzigen naar aanleiding van uw aanvullingen, kunt u dan ook de Niet technische Samenvatting aanpassen?”

Antwoord: Er zijn geen dieraantallen of ongeriefclassificaties veranderd.

Leges

De leges zijn nu voldaan.

Referenties

- d'Hollander, A., F. Massaux, M. Nevelsteen and S. Agoston (1982). "Age-dependent dose-response relationship of ORG NC 45 in anaesthetized patients." Br J Anaesth **54**(6): 653-657.
- Echeverria, P., G. R. Siber, J. Paisley, A. L. Smith, D. H. Smith, N. Jaffe and D. Paed (1975). "Age-dependent dose response to gentamicin." J Pediatr **87**(5): 805-808.



13.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

██████████ ██████████

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002017865

Bijlagen

1

Datum 17 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Op 10 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Myelination in schizofrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben gevraagd of u de leeftijd van de rattenpups kunt aangeven, het aantal dieren in bijlage 3.4.4.3 meer kunt onderbouwen en de ongeriefclassificatie voor de dieren in bijlage 3.4.4.4 procentueel kunt uitsplitsen.

U heeft de vragen beantwoord en op basis daarvan de bijlagen dierproeven aangepast.

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

Deze specifieke voorwaarde volgt uit de wijze waarop u het project heeft beschreven. Met duidelijk gedefinieerde go/no go momenten waardoor het uiteindelijk mogelijk is dat u minder dan de helft van het aantal aangevraagde dieren op dit project inzet. Dit is ook opgenomen in de aangeleverde NTS.

Deze dieren die niet gebruikt worden vanwege een no go in het project mogen niet voor andere doeleinden worden ingezet. In de aanvraag zijn de stoffen die u wilt gaan testen beschreven met een onderbouwing waarom u verwacht dat deze een effect kunnen hebben in het door u beschreven diermodel. Voor het

testen van andere stoffen ontbreekt deze onderbouwing.

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

U kunt met uw project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" starten. De vergunning wordt afgegeven van 16 maart 2017 tot en met 10 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 februari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



H. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 10 maart 2022, voor het project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 februari 2017, ontvangen op 10 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 maart 2017

Aanvraagnummer:
AVD103002017865

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Characterization: Molecular / Cellular / Structural				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / verschillende leeftijden, zie bijlage 3.4.4.1	438	100% Licht	
3.4.4.2 Characterization: Behaviour				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / volwassen [REDACTED] en [REDACTED] ratten	120	100% Licht	
3.4.4.3 Pharmacological manipulation				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / [REDACTED] en [REDACTED] ratten	2.760	100% Licht	
3.4.4.4 Behavioural manipulation				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / [REDACTED] en [REDACTED] 28 dagen oud en volwassen	420	14% Matig 84% Licht	

Voorwaarden

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

Algemene voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD103002017865

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.

Specifieke voorwaarde

Deze vergunning is alleen geldig voor het aantal in het projectvoorstel genoemde teststoffen. Wanneer u andere stoffen gaat testen, moet u dit middels een wijziging aanvragen bij de CCD, ook als het totaal aantal dieren van de vergunning niet wordt overschreden door go / no go momenten. Voor nieuwe stoffen kunt u middels een wijziging een onderbouwing indienen.



Aanvraagnummer:

AVD103002017865

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:
AVD103002017865

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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