

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

DECNR: 2011-044

Herziene versie

Ontvangen: 09 mei 2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2	VROM/GGONR ³	LNV/CBDNR ⁴
27-05-2011	Nieuw / Herz. versie / Pilot	NVT	NVT

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag (MHeNS)	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	----------------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject	1, 2, 3	1, 2, 3, 4	3	1, 2, 3			
-------------	---------	------------	---	---------	--	--	--

Financieel beheerder		Budgetnummer	30973647B
----------------------	--	--------------	-----------

Titel van het onderzoek:

Effecten van selectieve phosphodiesterase (PDE) remmers op object en spatiële herkenning: studie 21 t/m 30

startdatum April 2011 einddatum 9 April 2014 Duur van de proef¹⁰: 2 maanden

Naam	Tel (+ Tel privé Tel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)			Art. 9	
2. Vervanger VO (VVO)			Art. 9	
3. (VM) GGO ⁷				
4. overige uitvoerenden			Art. 12 Art. 9 Art. 9 Art. 9	

Diergroep	Studie 1	Studie 2	Studie 3	Studie 4	Studie 5	Studie 6	Studie 7	Studie 8	Studie 9	Studie 10	
ctrl/exp/sham	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	
Diersoort	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Stam	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	
Construct / mutatie ?	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	NVT	
Herkomst (leverancier) *	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	1 Harlan	
Aantal	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
Geslacht	Man	Man	Man	Man	Man	Man	Man	Man	Man	Man	
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	
Leeftijd/gewicht	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	3 mnd	
Doel van de proef *	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Belang van de proef *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Toxicologisch onderzoek *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Bijzondere technieken *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Anesthesie *	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Pijnbestrijding *	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Mate ongerief *	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Toestand dier einde exp*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

* VIII-coderingen zie bijlage

1 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: Effecten van selectieve phosphodiesterase (PDE) remmers op object en spatiële herkenning: studie 21 t/m 30

1. Doel van de proef.

Het project heeft tot doel na te gaan of behandeling met een nieuw ontwikkelde testsubstantie, positieve effecten heeft op de cognitieve vermogens van ratten. In het voorgestelde project zullen hiertoe de geheugeneffecten van twintig verschillende testsubstanties in een object herkenning taak bij jong-volwassen ratten worden onderzocht. Dit zal in tien studies gedaan worden, dat wil zeggen twee testsubstanties per studie. We hebben eerder aangetoond dat verschillende stoffen het geheugen van ratten verbeteren in een object herkenningstaak. In het kader van dit experiment willen we de effecten testen van selectieve phosphodiesterase (PDE) remmers. Deze substanties zijn gelicenseerd door de firma [] en wij willen de werkzaamheid van deze stoffen in onze testopstelling valideren op hun werkzaamheid.

Dit onderzoek is vergelijkbaar met eerdere DEC aanvragen waarin verschillende substanties getest zijn: DEC aanvraag 2008-114 met 5-HT6 antagonisten en CB1 antagonisten voor de firma [], DEC aanvraag 2009-035 met PDE remmers voor de firma [], Johnson PRD (België) en DEC aanvraag 2010-062 met PDE remmers voor de firma [].

PDE remmers zijn derhalve reeds eerder voor twee andere firma's in 20 studies getest vandaar dat de aanvraagde studies doornummers van 21 t/m 30. Maar de substanties die we nu moeten testen zijn weer anders qua molecuulstructuur/werkingsmechanisme en farmacokinetische/farmacodynamische eigenschappen. [] verwacht eerder positieve werkingen.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Het maatschappelijk belang van deze proef is gelegen in een mogelijk medicament dat de cognitieve functies van dementen (i.h.b. Alzheimer patiënten) kan verbeteren of de achteruitgang van deze functies kan tegengaan.

3. Alternatieven

Alternatieven voor de voorgestelde dierproeven zijn niet mogelijk omdat de nieuwe substanties nog niet geregistreerd zijn en daardoor humane studies niet mogelijk zijn. Er worden ratten gebruikt omdat dit een vergelijk mogelijk maakt met eerdere studies (wel andere testopstellingen) die uitgevoerd zijn met substanties met een vergelijkbaar werkingsmechanisme (op basis van eerdere studies). Tot op heden zijn er geen andere testmethoden voorhanden die op voorhand de mogelijke cognitieve werking van substanties kan voorspellen op grond van, bijvoorbeeld, *in vitro* studies. Dit type onderzoek is vooralsnog de enige methode om de mogelijke werking van substanties op geheugenfuncties te onderzoeken.

4. Ethische afweging

Er zijn op dit moment slechts 5 drugs op de markt ter behandeling van dementie bij de ziekte van Alzheimer. Dit zijn 4 acetylcholinesterase (AChE) remmers (zie punt 5) en 1 NMDA antagonist. De werkzaamheid van de laatste wordt nog steeds betwijfeld en de AChE remmers hebben een geringe effectiviteit met veel bijwerkingen. Derhalve vinden de aanvragers dat het aantal dieren en het ongerief van de dieren opweegt tegen het maatschappelijk nut van het onderzoek, namelijk een betere behandeling voor dementie, met name bij patiënten met de ziekte van Alzheimer.

2 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Eén van de meest prominente aspecten van de ziekte van Alzheimer is de achteruitgang in cognitieve functies. Deze achteruitgang heeft grote negatieve consequenties voor de patiënt zelf maar zeker ook voor zijn/haar directe omgeving. Alhoewel ook andere functies aangedaan zijn in deze neurodegeneratieve ziekte, wordt algemeen gesteld dat een verbetering van de cognitieve functies zeker tot een kwalitatief betere levenskwaliteit kan leiden. Alhoewel enkele serieuze medicamenten op het punt staan toegelaten te worden, ontbreekt thans een farmacologische behandeling van deze ziekte. Voor de behandeling van cognitieve stoornissen zijn op dit moment verschillende cholinesterase remmers op de markt verschenen. De ontwikkeling van een cholinerge substanties is gebaseerd op onderzoek van ongeveer 20 jaar geleden waarin naar voren kwam dat de neurotransmitter acetylcholine een belangrijke rol zou spelen bij leren en geheugen in het basale voorbrein, met name de hippocampus (e.g., Bartus et al., 1982; Hagan & Morris, 1988). Echter, de effectiviteit van de huidige substanties en het niet kunnen continueren van de behandeling als gevolg van negatieve bijwerkingen, heeft nog geen wenselijke verhouding, dwz. de effectiviteit is nog gering en de bijwerkingen nogal ernstig. Op dit moment zoekt men dan ook naar cholinesterase remmers die minder bijwerkingen hebben.

Recenter onderzoek heeft uitgewezen dat acetylcholine wellicht niet dé neurotransmitter is voor leren en geheugen, maar dat de functies van deze neurotransmitter waarschijnlijk gerelateerd dienen te worden aan aandachtsfuncties (e.g., Blokland, 1996; Muir, 1997; Sarter & Bruno, 1997). Het verbeteren van de aandachtsfuncties kan leiden tot een verbeterende verwerking van informatie, en als gevolg daarvan beter kunnen worden opgehaald uit het geheugen. Er wordt derhalve ook hard gezocht naar alternatieve drugs die specifiek het geheugen kunnen beïnvloeden.

Mogelijke nieuwe kandidaten voor geheugenverbeterende drugs zijn de zogenaamde PDE remmers. PDE remmers remmen de afbraak van cAMP en/of cGMP. Deze cyclische nucleotiden zijn betrokken bij de intracellulaire signaaltransductie van verschillende neurotransmitters (bijv. acetylcholine, serotonine, glutamaat). Remmers van PDE5 (bijv. vardenafil, sildenafil) of PDE9 (BAY 73-6691) remmen selectief de afbraak van cGMP en blijken het geheugen te verbeteren in proefdiermodellen (Prickaerts et al., 2004; Van der Staay, 2008). Er zijn aanwijzingen van studies met PDE10 knock-out muizen dat remming van PDE10 het geheugen eveneens kan verbeteren (Siuciak et al., 2006). PDE4 remmers (bijv. rolipram) welke selectief alleen de afbraak van cAMP remmen, kunnen ook aan deze lijst worden toegevoegd (Rutten et al., 2006). Er is pas 1 selectieve PDE2 remmer ontwikkeld, BAY 60-7550, welke zowel de afbraak van cAMP als cGMP remt. Deze PDE2 remmer verbeterde ook de geheugenprestatie in proefdiermodellen (Boess et al., 2004). Al met al zijn op grond van deze eigenschappen specifieke PDE remmers goede kandidaten voor het ontwikkelen van geheugenverbeterende substanties.

In deze studie worden de geheugenverbeterende substanties getest in een scopolamine (een acetylcholine muscarine antagonist) model of in een MK-801 (een NMDA antagonist). Beide modellen zijn specifiek voor respectievelijk cholinerg- als glutamaterg-gemedieerd vergeten. Derhalve zijn ze uitstekend geschikt voor het testen van cholinerge of glutamaterge substanties. Maar het geheugen bestaat niet alleen uit cholinerge en glutamaterge mechanismen. Derhalve kunnen deze modellen ook gebruikt worden om drugs met een niet-cholinerg of niet-glutamaterg werkingsmechanisme te testen, zoals in deze studie het geval is. Je verbetert het geheugen dan via een alternatieve route, terwijl de cholinerge of glutamaterge route geblokkeerd is.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC prot. col is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de directeur

3 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In deze studie zal gebruik gemaakt worden van 3 maanden oude mannelijke Wistar ratten (Harlan, NL). We kiezen voor de 3 maanden oude Wistar ratten omdat deze ook in onze voorgaande experimenten gebruikt zijn waarin de rol van alpha-7 nicotine agonisten, 5-HT6 antagonisten, CB1 antagonisten, cholinesterase remmers en liganden van het NO-cGMP systeem in geheugenprocessen onderzocht werd. We hebben eerder ervaring opgedaan met stamverschillen in deze object herkenning taak (Lewis ratten doen dit bijvoorbeeld heel wisselvallig).

Eindbestemming is dat de dieren gedood worden in het kader van de proef.

7b. Sexe

We willen gebruik maken van mannelijke ratten aangezien we dit ook in de eerdere projecten hebben gedaan waardoor we weten welke condities gekozen dienen te worden voor het testen van het geheugen. Bovendien kennen we de prestatie van deze dieren (3 maanden oude mannelijke Wistar ratten) in deze taak. Daarmee is een vergelijkbaarheid met eerdere studies mogelijk.

In een recente studie hebben we ook vrouwelijke ratten getest in deze taak. De prestatie van vrouwelijke dieren bleek zeer sterk afhankelijk van de fase van de cyclus die met vaginale uitstrijkjes bepaald werd. In de vruchtbare fase (oestrus) presteerden de vrouwelijke dieren beter dan mannelijke dieren. In de minst vruchtbare fase presteerden de vrouwelijke ratten slechter dan de mannelijke. Deze variatie in geheugenprestatie bemoeilijkt het onderzoek met name pragmatisch vanwege noodzakelijke cyclus bepalingen om de precieze absolute geheugenverbetering vast te stellen. Vandaar dat mannelijke ratten met hun constante geheugenprestatie in deze taak de voorkeur hebben.

7c. Aantallen

De belangrijkste uitleesparameter is de discriminatie index d2. Deze index is een relatieve maat voor object geheugen onafhankelijk van het exploratie gedrag omdat voor dit laatste gecorrigeerd wordt (voor meer informatie zie punt 8). Voor vergelijkingen tussen groepen/behandelingen worden alle d2 waarden met elkaar vergeleken.

Een groepsgrootte van 10 ratten nodig is om een betrouwbare statistische uitspraak te kunnen doen op basis van ervaring uit eerdere experimenten in dezelfde taak met dezelfde stam; Een power-analyse laat zien dat bij een verondersteld verschil van gemiddelden van 0.25 op de uitleesparameter d2, een spreiding (standaard deviatie) van 0.2 (gezien onze eerdere ervaring met deze test), en een power van 80%, een groepsgrootte van $(n = 15,7 * (\sigma/\delta)^2 = 15,7 * (0.2/0.25)^2 = 10.1)$ 10 dieren per experiment nodig is. In de eerdere studies hebben we gevonden dat ongeveer 1 tot 2 ratten vaak niet genoeg exploratieactiviteit vertoonden en diensgevolge uit het experiment genomen dienden te worden. Bij een groepsgrootte van 10 en dit percentage uitval van 10-20% is het totale aantal te testen dieren gemiddeld $((10.1/0.85) = 11.9)$ 12. Derhalve zullen we per testsubstantie 12 ratten gebruiken, waarbij elk dier zijn eigen controle is (within-design).

We zullen twintig testsubstanties testen. Zoals gebruikelijk in ons lab testen we twee substanties meteen achter elkaar in één studie. Aangezien we per testsubstantie 12 ratten nodig hebben, hebben we per studie derhalve 24 dieren nodig. Er zullen tien studies gedaan worden. Totaal aantal dieren: 240.

4 Dierproef

8. Experiment

Onderstaande protocol is voor 1 studie, d.w.z. twee testsubstanties die elk in 12 dieren getest worden.

De dieren zullen worden getest in een opstelling waarin ze vrij kunnen rondlopen. In de open arena staan twee objecten die ze kunnen 'onderzoeken'. Deze drie minuten durende trial wordt na een bepaald interval (i.e., 1 uur) herhaald. Dat wil zeggen, normaal zullen dieren een goed geheugen laten zien bij een interval van 1 uur, maar de prestatie is slecht als er een 24 uur interval is tussen de eerste en tweede aanbieding. Bij het testen zullen de ratten een i.p., p.o. of CNS (meestal hippocampus) injectie krijgen met de testsubstantie. Injectie type hangt af van de eigenschappen van de testsubstantie. Sommige substanties zijn vroeg in ontwikkeling en nog niet geschikt voor orale toediening vanwege slechte opname (first-pass) eigenschappen. Andere substanties moeten rechtstreeks in het CNS geïnjecteerd worden omdat ze niet door de bloed-brein-barrière (BBB) komen. Naam testsubstanties: ; de doseringen voor beide substanties zijn in de regel, 0.03, 0.1, en 0.3 mg/kg in 2 ml/kg. Bij CNS injecties zal dit in de orde van μg (absolute hoeveelheden) zijn. Besluit de firma hier toch vanaf te wijken dan schuift de dosis logaritmisch op (maximaal tot 30 mg/kg, bij CNS injecties maximaal tot 2 μg). Een test substantie dient 0.5 uur van te voren te worden gegeven.

praktische uitvoering van proef

Indien CNS injecties nodig zijn, zullen onder volledige narcose met behulp van een stereotactische operatie canules worden geïmplant. Meestal zal dit in de hippocampus zijn. Voor de praktische en algemene handelingen gedurende de stereotactische procedure verwijzen we naar de bijgevoegde SOP-PSY01 onder punt 13.

Er zullen twee versies van de object herkenningstaak gebruikt worden, een object geheugen versie en een locatie/spatiële geheugen versie. Het enige verschil tussen beide versies is dat in de object versie het object zelf onthouden dient te worden, tegenover de locatie van het object in de spatiële versie.

In de object herkenningstaak worden de ratten 3 min in een circulaire arena (doorsnede 83 cm en 40 cm hoog) gezet waarin twee identieke objecten staan. Een rat kan dan vrij exploreren en zal een gedeelte van de tijd aan de objecten snuffelen/exploreren. Het gedrag, i.e., de duur van contact aan de afzonderlijke voorwerpen, wordt door een geoefend persoon gescoord en opgeslagen op een PC. Als de dieren 1 uur later in dezelfde arena worden gezet met twee objecten waarvan 1 nieuw is en het andere hetzelfde object dat in de eerste 3 min ook aanwezig was, zal een rat meer tijd aan het nieuwe object snuffelen. In de object locatie taak zijn beide objecten dan identiek aan die van de eerste testfase. Echter 1 object wordt op een andere locatie in de arena geplaatst en geldt dan als het 'nieuwe' object.

Als echter 6 of 24 uur verstrijkt tussen de twee testfasen, zal een dier in de tweede testfase minder (na 6 uur) of ongeveer evenveel tijd (na 24 uur) snuffelen aan het bekende en onbekende object. De discriminatie index d_2 is een relatieve maat voor object geheugen: $(\text{exploratie tijd nieuwe object} - \text{exploratie tijd oude object}) / (\text{exploratie tijd nieuwe object} + \text{exploratie tijd oude object})$. Als een dier in trial 2 beide objecten derhalve even veel exploreert, dan zal d_2 ongeveer gelijk aan nul zijn. Als de d_2 groter dan nul is, dan geeft dit aan dat het oude object herkend wordt. Het wordt aangenomen dat dit te maken heeft met het geheugen (object of spatiel)

herkenningsgeheugen afhankelijk van de taak versie).

Na 24 uur is een rat vergeten welk object of locatie in de eerste testfase aanwezig was. Dit gedrag is vrij stabiel en kan herhaaldelijk getest worden. In deze studie zullen we niet het normaal vergeten onderzoeken maar een scopolamine model (0.1 mg/kg in 1 ml/kg, i.p. 30 min voor Trial 1) of MK-801 model (0.125 mg/kg, i.p. 30 min voor Trial 1) voor amnesia gebruiken. Het interval tussen Trial 1 en Trial 2 is in dat geval 1 uur. In dit experiment willen we dus op deze manier testen of de substanties het vergeten kunnen verbeteren.

Per studie wordt in overleg met besloten welke paradigma, d.w.z. object of spatieel, en scopolamine of MK-801, getest gaat worden.

De ratten zullen in elke week op maandag, woensdag en vrijdag getest worden. De spatiëring van één dag (dinsdag en donderdag niet testen) is gekozen om mogelijke resteffecten van substanties te minimaliseren. Nu is er een injectie-interval van 48 uur, hetgeen op basis van de voorhanden informatie voldoende is voor een totale clearing van de substanties, zodat er geen interferentie kan optreden tussen injecties. Tenslotte, de experimentator weet niet welke drug getest wordt en alle doseringen worden random gebalanceerd elke dag gegeven.

Plasma bepalingen

Na beëindiging van de gedragsexperimenten zullen de dieren worden gebruikt voor bloedafname. De opdrachtgever wil graag de plasmawaarden van de substantie [effectieve dosering] mg/kg, in 2 ml/kg, i.p. of p.o.) weten omdat deze extra informatie geven over een mogelijke effectieve dosering bij mensen. Voor deze extra ingreep geven we de dieren nogmaals een substantie Na 1.5 uur zal er maximaal ongeveer 300 µl bloed worden afgenomen met de 'saphenous vein puncture' op het dijbeen (Hem et al., 1998 en zie SOP CPV-3-MR). Hiertoe wordt met een injectienaaldje een klein gaatje geprikt in deze vene. 1.5 uur is gekozen om zodoende de plasma waarde direct met de geheugenprestatie op 1.5 uur na toediening te vergelijken (zie boven).

Tijdslijn van 1 testsubstantie

- Week 1: Individueel huisvesten en habituatie aan lab met omgekeerd dag-nacht ritme
- Week 2: Stereotactische operatie (2x Temgesic injectie s.c.) als testsubstantie CNS gegeven moet worden.
- Week 3: Habituatie aan de testopstelling en experimentator; Ratten worden 2 dagen voor 5 min in de circulaire arena gezet
- Week 4: Meten van de vergeetcurve; Dag 1 (1 uur interval tussen trial 1 en 2), dag 3 (trial 1) en dag 4 (24 uur later trial 2)
- Week 5: Habituatie aan injecties met saline i.p., p.o. en eventueel CNS als de testsubstantie zo gegeven gaat worden op dag 1 en 3. Dit is noodzakelijk omdat zonder habituatie aan injecties met vloeistoffen de eerste gedragstesten niet gebruikt kunnen worden vanwege interferentie met stress als gevolg van de injectie met een vloeistof (Blokland et al., 1998). Op dag 5 een 1 uur interval test met saline injectie i.p., p.o. en eventueel CNS als de testsubstantie zo gegeven gaat worden (baseline meting).
- Week 6: Testsubstantie 1 testen in eerste groep van 12 ratten; Dag 1, 3 en 5 worden de dieren getest waarbij 1 i.p. injectie scopolamine of MK-801 wordt gegeven samen met 1 p.o., i.p. of CNS dosering van de drug. Doseringen zijn gebalanceerd over de dagen.

Week 7: Testsubstantie 2 testen in tweede groep van 12 ratten; Als week 6

Week 8: Plasma en brein verzamelen na behandeling met meest effectieve dosering van elke testsubstantie (alleen p.o., i.p. of CNS injectie met de drug)

Totaal aantal injecties:

-stereotactische operatie (als testsubstantie CNS gegeven wordt: 2 s.c. Temgesic

-oefen injecties: 2 i.p. en 2 p.o. of CNS (p.o. of CNS alleen als testsubstanties zo gegeven gaat worden)

-baseline: 1 i.p. en 1 p.o. of CNS (p.o. of CNS alleen als testsubstantie zo gegeven gaat worden)

-testsubstantie: 3 i.p. met scopolamine of MK801 en 3 i.p., p.o. of CNS met de testsubstantie.

-plasma en brein verzamelen: 1 i.p., p.o. of CNS met de testsubstantie

Totaal per rat:

-als testsubstantie i.p. gegeven wordt: 10 i.p. (totaal aantal injecties 10)

-als testsubstantie p.o. gegeven wordt: 6 i.p. en 7 p.o. (totaal aantal injecties 13)

-als testsubstantie CNS gegeven wordt: 2 s.c., 6 i.p. en 7 CNS (totaal aantal injecties 15)

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie zal tijdens de stereotactische operatie worden aangewend zoals in het bijgevoegde SOP-PSY01 beschreven is.

9b. Pijnbestrijding

Zoals in de bijgevoegde SOP-PSY01 beschreven is, zullen de dieren een half uur voor de operatie met Temgesic (buprenorphine, 0.05 mg/kg, s.c.) worden behandeld. Indien nodig zal postoperatief de behandeling met Temgesic herhaald worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- Aan het einde van de proef worden de dieren middels decapitatie geëuthanaseerd en worden de breinen gedissecteed en ingevroren voor eventuele verdere analyses. De dieren worden hiertoe niet verdoofd omdat anesthesie de drug kan beïnvloeden. Decapitatie vindt plaats meteen na bloedafname via de Saphena Vene. Zogenaamd 'trunc' bloed na decapitatie wordt niet gebruikt voor plasma bepalingen van de testsubstantie omdat dit geen zuiver bloed is (bevat hersenvocht, longvocht etc.).
- Indien een dier 'slecht' reageert op een substantie (ofschoon we dat niet verwachten, zie punt 10) of indien tijdens de proef een dier ernstig ziek wordt of significant lijdt agv van het experiment of door een andere oorzaak (infectie operatie/canule, tumor etc.), dan zal het dier euthanasie ondergaan middels decapitatie zonder verdoving. Humane eindpunten in deze zijn een sterk uitgedroogde en/of sterk apatische indruk en/of afname in lichaamsgewicht met meer dan 15% gewichtsverlies binnen 2-3 dagen. Indien er twijfel bestaat over de ernst van het lijden of de mogelijkheid van de behandeling van de oorzaak, dan zal de CPV-dierenarts (art. 14) geraadpleegd worden.

10a. Ongerief

Alle stoffen zijn eerder toxicologisch getest binnen de firma ... Alleen toxicologisch 'veilige' stoffen worden door ons getest. De operatie en het ondergaan van algehele narcose dient als matig/ernstig ongerief (code 4) te worden ingeschat. Dit zal vooral na de operatie zijn (1 a 2 dagen). Alle beschreven ingrepen (herhaalde intraperitoneale/per os/CNS injecties en eenmalige bloedafname) worden voor het dier als 'matig ongerief' (cat. 3) beoordeeld. De toegediende stoffen hebben geen irriterende werking en hebben geen invloed op het welbevinden van het dier. Het individueel huisvesten van dieren kan als ongerief cat. 4 (matig/ernstig) worden ingeschat aangezien ratten sociale dieren zijn. Voor een gedetailleerd overzicht van het ongerief zie de tabel.

<i>Handeling/test</i>	<i>Aard ongerief</i>	<i>Ongerief score</i>	<i>Duur en frequentie</i>
Individueel huisvesten	Individuele huisvesting	4	Doorlopend (7 wk)
Stereotactische operatie	Stress, pijn	4	45 min – 1x
Temgesic injecties	Injectie	3	2x
Oefen injecties (zonder gedrag)	Injectie (i.p.*, p.o. of CNS)	3	2x minimaal – 4x maximaal
Object herkenningstaak: Habituatie Vergeetcurve Baseline Doseringen testen	Open veld stress	3	2 trials per sessie 5 min – 2x (1 sessie) 3 min – 4x (2 sessies) 3 min – 2x (1 sessie) 3 min – 6x (3 sessies)
Baseline injectie testen	Injectie (i.p.*, p.o. of CNS)	3	1x minimaal – 2x maximaal
Scopolamine/MK801 inj. +	Injectie (i.p.)	3	3x
Drug injecties (dosering)	Injectie (i.p., p.o. of CNS)	3	3x
Bloed/brein collectie: Optimale dosering inj.	Injectie (i.p., p.o. of CNS)	3	1x
Bloedprikken	Bloed prikken Saph. Vene	3	1x
Decapitatie/dissectie	Decapitatie	1	

*indien een testsubstantie i.p. gegeven wordt is het totaal aantal injecties 10 i.p.v. 13. Indien een testsubstantie CNS gegeven wordt dan gaat het totaal van 13 naar 15 vanwege de Temgesic injecties bij de stereotactische operatie. Voor een gedetailleerde beschrijving van de injecties zie punt 8 boven.

Op basis van bovenstaande, d.w.z. meerdere keren ongerief categorie 3-4, wordt het 'overall' ongerief van deze studie op cat. 5 ingeschat.

10b. Welzijnsevaluatie

Bovenstaande inschattingen zijn gebaseerd op eerdere ervaringen (met name DEC 2007-102). Ongerief observaties zullen in het welzijnsdagboek genoteerd worden om het ongerief voor toekomstige studies in te schatten. Parameters in deze zijn de algemene houding/conditie, voedselname, faecesproductie en waterconsumptie van het dier.

11. Verzorging en huisvesting

Alle ratten zullen individueel gehuisvest worden totdat het experiment is afgerond. Bovendien zullen de ratten op een omgekeerd dag/nacht cyclus gehouden te worden. We hebben een tijd geleden een experiment gedaan (DEC 2000-03) waaruit bleek dat de prestatie van

sociaal gehuisveste ratten afweek van eerdere experimenten. We nemen vooralsnog aan dat dit te maken heeft met de huisvesting aangezien alle andere denkbare condities hetzelfde gebleven waren. Recentelijk is na een verzoek vanuit de DEC besloten om het aspect van individuele huisvesting nogmaals nader te onderzoeken (ook in overleg met art. 14 functionaris). Binnen het kader van de DEC aanvraag 2006-138 werden de prestaties van individueel gehuisveste dieren vergeleken met die van sociaal gehuisveste dieren, ook na farmacologische behandelingen. Weer bleek dat individueel gehuisveste ratten de beste geheugen prestaties leveren en derhalve het meest geschikt zijn voor dit type onderzoek.

12. Deskundigheid

De VO heeft als art. 9 functionaris een jarenlange ervaring met het opzetten en uitvoeren van tientallen dierexperimentele studies. De VVO en overige uitvoerenden zijn art. 9 of art. 12 en hebben eveneens een ruime werkervaring met dit soort studies.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

SOP PSY01: STEREOTAKTISCHE OPERATIE

Nummer: SOP-PSY01

Versie: 15

Datum: 2 maart 2011

Auteur: .

5

Inleiding

Indien een onderzoeksvraagstelling verlangt dat een gedefinieerde kern in de rat- of muishersenen chemisch, biologisch (DNA plasmide) of farmacologisch wordt geprikkeld, of dat er een afleiding van hersenpotentialen wordt gemeten, kan dit worden gedaan met behulp van stereotactische procedures. De rat- en muishersenen zijn in kaart gebracht (e.g., Paxinos & Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, 1986; Paxinos & Franklin, The mouse brain in stereotaxic coordinates, 1997). Nadat de kop van de rat of muis in de gewenste positie in de stereotaxer is gebracht, biedt het coördinatenstelsel van de hersenatlas de mogelijkheid de exacte positie van de verschillende gebieden te bepalen. De positiebepaling van de hersengebieden kan gedaan worden vanuit drie referentiepunten, i.e., het bregma, het lambda, of de interauraal lijn. Deze referentiepunten kunnen alleen gebruikt worden indien de muis tijdens de operatie gefixeerd is, en de positie van de manipulatorarm (met daaraan vastgemonteerd een, ijknaald, spuit, electrode, of canule) en het referentiepunt ten opzichte van elkaar hetzelfde blijft. De manipulatorarm is aan het fixatie gedeelte verbonden, en het totale apparaat wordt een stereotaxer ('stereotactic frame') genoemd.

Deze methode kan ook gebruikt worden voor het plaatsen van elektrodes, waarmee de hersenactiviteit (potentialen) gemeten kan worden.

De mate van ongerief is 4.

Anaesthesie en analgesie bij operatie

Om een mogelijke pijncomponent te bestrijden zullen de dieren voor de operatie, evenals 8 uur na de operatie, een injectie krijgen met Temgesic (rat 0.05 mg/kg, s.c.; muis 0.1 mg/kg s.c.). De stereotactische operatie wordt onder algehele narcose uitgevoerd. Om de rat of muis onder narcose te krijgen wordt ze in een inductie kastje gezet met een gasmengsel van



lucht en isofluraan (4%). Als het dier onder narcose is, wordt een narcose masker aangebracht om de narcose te onderhouden met het gasmengsel (2,5% isofluraan). Voordat het dier in de stereotacter gefixeerd wordt, dient de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen te zijn. Narcose wordt ook in de stereotacter onderhouden via het narcose masker. De ogen zullen met oogzalf worden behandeld om zodanig uitdroging te voorkomen. Ook zal gekeken worden of de ademhaling diep en regelmatig is (ook na toediening van matige pijnprikkels). Aangezien het periost wordt verwijderd op de schedel, zal tevens lokaal lidocaine op de wond worden toegediend. De behandeling met Temgesic wordt eventueel 's morgens herhaald indien mocht blijken dat een rat of muis nog tekenen van ongerief vertoont.

Apparaat en procedures

De haren op de hoofdhuid worden afgeschoren en verwijderd. Daarna wordt de rat of muis in de stereotacter gezet. Met behulp van twee stompe oorpennen, die in de gehoorgang van het dier gebracht worden, en een bekklem voor de snijtanden, wordt de kop van de rat of muis gefixeerd.

Na desinfectie van de hoofdhuid met betadine wordt de schedel vrijgemaakt door een incisie in de hoofdhuid. Alle operatie materialen (scalpels, wondklemmen, naalden etc.) worden voor gebruik gesteriliseerd. De huid wordt zodanig gefixeerd dat de schedel goed bereikbaar is. Daarna wordt de schedel schoon en droog gemaakt met steriele watjes. De schedel wordt in een horizontale positie gebracht door de referentiepunten bregma en lambda op dezelfde hoogte in te stellen. Vervolgens wordt de middellijn (i.e., lijn door lambda en bregma) bepaald.

Nadat de rat of muis in het stereotactische frame is gefixeerd ligt het referentiepunt voor de interauraal lijn vast. Om het referentiepunt bregma/lambda te bepalen moet de ijknaald naar het bregma/lambda gebracht worden en deze coördinaten opgeschreven worden. Deze coördinaten moeten aangepast worden aan de gewenste atlascoördinaten. Dan wordt op de laterale en de anterior/posterior coördinaten de schedel doorboord tot aan de dura (diameter van boorgat 0.8 mm). Nadat het gat in de schedel is geboord wordt de dura mater met een injectienaald doorgeprikt. Vervolgens kan men met de naald of canule naar de van te voren vastgestelde dorsoventrale coördinaat.

Acute injectie van farmaca/DNA Plasmides

Voor eenmalige injecties worden farmaca/DNA plasmides met een speciale spuit (Hamilton™) in de hersenen geïnjecteerd. De spuit wordt langzaam naar de injectieplaats gebracht. Als die positie bereikt is wordt begonnen met het injecteren. De snelheid is afhankelijk van het volume dat geïnjecteerd wordt. Indien een groot volume (meer dan 1 µl) wordt geïnjecteerd zal langzamer geïnjecteerd dienen te worden (0.5 µl/min). Indien een kleiner volume geïnjecteerd wordt (minder dan 1 µl) kan een snellere snelheid worden toegepast. Dit heeft te maken met het feit dat een groter volume meer tijd dient te krijgen om te diffunderen in het weefsel zodat er geen aanzienlijke schade wordt veroorzaakt door volumedruk. Om deze injectiesnelheid precies te bepalen wordt gebruikt gemaakt van een microinfusiepomp. Nadat de substantie is ingespoten wordt 1 min gewacht alvorens de spuit langzaam wordt teruggetrokken.

Electroporatie procedure DNA plasmides

Om efficiëntie van de intracellulaire opname van DNA plasmides te verhogen wordt gebruikt gemaakt van electroporatie. Tien minuten na de craniale incisie en stereotactisch injectie van

plasmide DNA (2.5 µg/µl in saline) worden 2 naaldelektrodes geplaatst op 1 mm anterior en 1 mm posterior van de injectieplaats. Vervolgens worden 5 geblokte pulsen gegeven op 1 Hz, met een duur van 50 ms en 125 µA. Contralateraal kan deze procedure herhaald worden.

Plaatsen van canules

Indien men meerdere malen een farmacon wil toedienen worden vaste canules geplaatst. Zodoende hoeft men de dieren niet telkens weer te narcotiseren. Eerst worden er twee verdere gaatjes in de schedel geboord. Hier worden schroefjes (M1x2) in gedraaid die als verankering voor de canule dienen. De roestvrijstale canules hebben een buitendiameter van 0.65 mm en de binnendiameter van 0.30 mm. De canule wordt naar de van tevoren bepaalde coördinaten gebracht. Met behulp van cement (Paladur™) wordt de canule op de schedel aan de schroefjes verankerd. Men dient ervoor te zorgen dat tijdens het aanbrengen van de cement de schedel droog blijft.

Plaatsen van elektrodes

Middels de stereotactische operatie kunnen ook elektrodes op de schedel worden bevestigd die het mogelijk maken de hersenactiviteit te meten (i.e., EEG). De elektrodes dienen op een van tevoren bepaalde plaats in het brein te worden gebracht, waarna ze met behulp van cement (Paladur™) op de schedel worden vastgemaakt. Twee verdere schroefjes (M1x2) worden in de schedel geschroefd en dienen voor verankering van de verschillende elektrodes. De elektrodes zijn verbonden met een connector (CANON, type DCDA-9S-S) waardoor de kabel gemakkelijk gekoppeld kan worden aan een andere connector die verbinding maakt met de versterker. Het dier heeft na de operatie dus een connector op het hoofd, en zal tijdens de metingen worden 'aangekoppeld'.

SOP CPV-3-MR: BLOEDAFNAME VIA VENA SAPHENA

Doel:

Het herhaaldelijk afnemen van kleine hoeveelheden bloed zonder anesthesie via de vena saphena.

Benodigdheden:

- muis – naald (oranje): 0.5 mm x 16 mm, 25G x 5/8"
- rat – naald (blauw): 0.5 mm x 25 mm, 23 G)
- Fixatiedoek (om het dier in te fixeren, bijv. washandje of handdoek)
- Gaasjes of tissues
- Warmtebron: infrarode lamp (150 Watt) of Warmtebox (Beta Corp)
- Scheerapparaat
- Cupjes (al dan niet gehepariniseerd)

Voorbereiding:

- Het dier indien nodig verwarmen m.b.v. een waterlamp of -box, om de vena saphena goed zichtbaar te maken. Gedurende het opwarmen bij het dier blijven.
 - * Warmtelamp: minimale afstand tot het dier 50 cm
Duur: minimaal 5 tot maximaal 15 minuten.
 - * Warmtebox:
Temperatuur instellen op ongeveer 37°C
Duur: minimaal 5 tot maximaal 15 minuten.

- De linker of rechter achterpoot wordt geschoren ter hoogte van de hak aan de laterale zijde.
- Het dier wordt gefixeerd door het tot het bekken in een speciaal daarvoor gemaakte dubbelgestikte washand (CPV) te laten lopen (of kies een andere manier van restraining).
- Het dier wordt vervolgens met de volle hand over de rug stevig rond het bekken vast gepakt.
- De rechter of linker achterpoot wordt gefixeerd tussen duim en wijsvinger zodat de poot gestrekt wordt.
- De poot wordt gestuwd door meer of minder druk op de binnenzijde van het bovenbeen (liesgebied) uit te oefenen.

Bloedafname:

- Zodra de vene goed zichtbaar is, wordt deze aangeprikt in het midden van het vat loodrecht op de huid.
- Door meer of minder te stuwen kan de uitstromende hoeveelheid beïnvloedt worden.
- Het bloed wordt opgevangen in een cupje.
- Per dier wordt een nieuwe naald gebruikt.

Nazorg:

- Tijdens en na afloop van de bloedafname wordt gecontroleerd of het dier ongewenste effecten van de handeling ondervindt.
- Na de bloedafname wordt gedurende enkele seconden de aanprikplek met een gaasje dichtgedrukt. Om het bloeden te verminderen kan ook de voet geflexed worden.

Voor de methode van bloedafname via de 'saphenous vein puncture' wordt ook verwezen naar het artikel van Hem et al. (1998).

Zie verder: http://www.uib.no/vivariet/mou_blood/Blood_coll_mice_.html

Relevante literatuur

Bartus RT, Dean RL, Beer B and Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-417.

Blokland A (1996). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews* 21, 285-300.

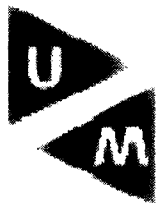
Blokland A, Prickaerts J, Honig W and De Vente J (1998). State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *NeuroReport* 9, 4205-4208

Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W, de Vente J, Prickaerts J, Blokland A, and Koenig G (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47, 1081-1092.

Hagan JJ and Morris RGM (1988). The cholinergic hypothesis of memory: a review of animal experiments. In LL Iversen, SD Iversen, & S H Snyder (Eds.), *Handbook of psychopharmacology* (Vol. 1, pp. 237-305). New York: Plenum Press.

Hem A, Smith AJ and Solberg P (1998) Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink *Laboratory Animals* 32, 364-368.

- Muir JL (1997). Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 56, 687-696.
- Prickaerts J, Sik A, Van Staveren, WC, Koopmans, G, Steinbusch, HWM, Van der Staay FJ, De Vente J and Blokland A (2004). Phosphodiesterase type 5 improves early memory consolidation of object information. *Neurochemistry International* 45, 915-928.
- Rutten K, Prickaerts J, and Blokland A (2006) Rolipram reverses scopolamine-induced and time-dependent memory deficits in object recognition by different mechanisms of action. *Neurobiology of Learning and Memory* 85, 132-138
- Sarter M and Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*, 23, 28-46.
- Steckler, T and Sahgal, A. (1995). The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behaviour. *Behavioural Brain Research* 67, 165-199.
- Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Fujiwara RA, James LC, Williams RD, Stock JL, McNeish JD, Strick CA, Menniti FS, and Schmidt CJ (2006). Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology* 51, 374-385.
- Van der Staay FJ, Rutten K, Barfacker L, De Vry J, Erb C, Heckroth H, Karthaus D, Tersteegen A, Van Kampen M, Blokland A, Prickaerts J, Reymann KG, Schroder UH, and Hendrix M (2008). The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology* 55, 908-918.



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon:

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effecten van selectieve phosphodiesterase(PDE) remmers op object en spatiële herkenning: studie 21 t/m 30*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de overige uitvoerende van het voorblad te verwijderen, hij is niet art.9 bevoegd.
- De coderingen van de pijnbestrijding en de anesthesie op het voorblad zijn niet juist, de DEC verzoekt deze aan te passen.
- De DEC verzoekt het doel van de proef bij punt 1 te vermelden en niet bij punt 2.
- Bij punt 6 verzoekt de DEC "HS" voluit te schrijven of hem op het voorblad te vermelden als PI.
- De DEC verzoekt de uitleesparameter te vermelden bij punt 7c en niet bij punt 8.
- Bij punt 7c is het is het voor de DEC niet duidelijk of met 1 studie, 1 dier wordt bedoeld of 1 stof. Indien het 1 dier zou zijn, zou het totaal aantal dieren gedeeld moeten worden door 2. De DEC wenst een toelichting.
- Bij punt 8 wenst de DEC een beschrijving van de 2 paradigma's, inclusief het eventuele ongerief.
- De DEC verzoekt bij punt 9b de dosering van de postoperatieve pijnbestrijding aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige (ook in SOP). Indien mogelijk, verzoekt de DEC gebruik te maken van NSAID's.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. Dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad. (Herhaalde intraperitoneale injecties, aangeven hoe vaak)

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.
Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer 2011-044, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Maastricht, 9-5-2011

Beste leden van de DEC,

Met betrekking tot het onderzoeksvoorstel, getiteld "*Effecten van selectieve phosphodiesterase (PDE) remmers op object en spatiële herkenning: studie 21 t/m 30*" (2011-044), heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt de overige uitvoerende van het voorblad te verwijderen, hij is niet art.9 bevoegd.
 - *Antwoord:* is van het voorblad verwijderd. Na het behalen van het art. 9 certificaat (begin juni 2011) zullen wij het voorblad laten aanpassen.
- De coderingen van de pijnbestrijding en de anesthesie op het voorblad zijn niet juist, de DEC verzoekt deze aan te passen.
 - *Antwoord:* De juiste codes voor pijnbestrijding en anesthesie zijn nu vermeld op het voorblad. Tevens is de ongeriefscore aangepast, d.w.z. vanwege meerdere keren ongerief categorie 3-4, wordt het 'overall' ongerief van deze studie op categorie 5 ingeschat.
- De DEC verzoekt het doel van de proef bij punt 1 te vermelden en niet bij punt 2.
 - *Antwoord:* Het doel van de proef wordt nu onder punt 1 vermeld (eerste zin).
- Bij punt 6 verzoekt de DEC " " voluit te schrijven of hem op het voorblad te vermelden als PI.
 - *Antwoord:* HS is nu voluit geschreven
- De DEC verzoekt de uitleesparameter te vermelden bij punt 7c en niet bij punt 8.
 - *Antwoord:* De uitleesparameter *an sich* wordt nu reeds onder punt 7c genoemd. De precieze definitie van de uitleesparameter wordt echter nog steeds onder punt 8 vermeld omdat deze definitie pas duidelijk wordt nadat de geheugen taak onder punt 8 is uitgelegd.
- Bij punt 7c is het is het voor de DEC niet duidelijk of met 1 studie, 1 dier wordt bedoeld of 1 stof. Indien het 1 dier zou zijn, zou het totaal aantal dieren gedeeld moeten worden door 2. De DEC wenst een toelichting.
 - *Antwoord:* 1 stof wordt in 1 dier getest. Per stof worden 12 dieren gebruikt. Per studie worden 2 stoffen getest, dus 24 dieren in totaal per studie. De volgende zin is ter verduidelijking toegevoegd onder punt 7c 'Aangezien we per testsubstantie 12 ratten nodig hebben, hebben we per studie derhalve 24 dieren nodig'. Tevens hebben we extra vermeld dat er een within design wordt gebruikt, d.w.z. elk dier is zijn eigen controle.
- Bij punt 8 wenst de DEC een beschrijving van de 2 paradigma's, inclusief het eventuele ongerief.
 - *Antwoord:* Onder punt 8 wordt nu eerst uitgelegd dat er in feite voor de rat totaal geen verschil is tussen beide test paradigma's is, d.w.z. in plaats van een nieuw voorwerp op een bekende locatie wordt er een bekend voorwerp op een nieuwe locatie gezet. De keuze voor één van beide paradigma's ligt bij het farmaceutische bedrijf (zoals ook aangegeven in onder punt 8).

- * De DEC verzoekt bij punt 9b de dosering van de postoperatieve pijnbestrijding aan te passen in overleg met de proefdierdeskundige (ook in SOP). Indien mogelijk, verzoekt de DEC gebruik te maken van NSAID's.
 - o *Antwoord:* na overleg met de proefdierdeskundige zijn in de aanvraag/SOP de doseringen voor Temgesic (buprenorphine) aangepast per species, d.w.z. rat 0.05 mg/kg (s.c.) en muis 0.1 mg/kg (s.c.). Gedurende het experiment zal bekeken worden om NSAID's te testen en te vergelijken met het gebruik van buprenorphine. Wij zullen hiertoe contact opnemen met de proefdierdeskundige.
- * Bij punt 10a verzoekt de DEC in een tabel, de aard, ernst, duur en frequentie beter te definiëren per handeling en groep, en het totale ongerief aan te geven. Dit moet in overeenstemming zijn met het voorblad. (Herhaalde intraperitoneale injecties, aangeven hoe vaak)
 - o *Antwoord:* Onder punt 10a is nu een tabel opgenomen waarbij aard, ernst, duur en frequentie zijn weergegeven per handeling. Dit is nu ook in overeenstemming met het voorblad met een totaal ongerief score van 5. Het totaal aantal injecties wordt vermeld onder punt 10a en tevens in detail uitgelegd onder punt 8.

Voor verdere vragen kunt u mij altijd bellen/mailen.

Met vriendelijke groeten,



Aan

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

31-05-2011

*Project: Effecten van selectieve phosphodiesterase (PDE) remmers op
object en spatiële herkenning: studie 21 t/m 30.*

DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

p/a secretariaat DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

Secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische
toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Bezoekadres

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals
aangevraagd en geeft een positief advies.

Postadres

Postbus 616

6200 MD Maastricht

Projectnummer: 2011-044

Diersoort: rat

Aantal dieren: 240

Einddatum: 27-05-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand
nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit
nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM