

68

1

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM**DECNR: 2011-134**

Versie 2006

Herziene versie**Ontvangen: 10-11-2011**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag ₂
10-11-2011	Nieuw

VROM/GGONR³LNV/CBDNR⁴

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

Deelproject	1. 2. 3.	1. 2. 3. 4.	3.	1. 2. 3.			
-------------	----------	-------------	----	----------	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer 3097 3345 N

Titel van het onderzoek:

Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processingstartdatum **1-11-2011**einddatum⁹ **01-08-2012**Duur van de proef¹⁰:

5 wk

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

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	sham	Exp1	Exp2	Exp3			
Diersoort	Rat	Rat	Rat	Rat			
Stam	Sprague Dawley	Sprague Dawley	Sprague Dawley	Sprague Dawley			
Construct / mutatie ?	-	-	-	-			
Herkomst (leverancier) *	02 (CR)	02 (CR)	02 (CR)	02 (CR)			
Aantal	28	40	40	40			
Geslacht	M	M	M	M			
Dieren immuuncompetent ?	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸	ja ⁸			
Leeftijd/gewicht							
Doel van de proef *	32	32	32	32			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	10	10	10			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	04	04	04	04			
Mate ongerief *	05	05	05	05			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

* VHI-coderingen zie bijlage

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing

1. Doel van de proef.

De ziekte van Parkinson (zvP) is een progressieve neurodegeneratieve aandoening, die gekenmerkt wordt door problemen met de motoriek. De klassieke symptomen zijn beven (tremor), stijfheid (rigiditeit) en traagheid (hypokinesie). Ten grondslag aan deze ziekte ligt vooral de degeneratie van dopamine producerende cellen in de hersenen, maar ook de serotonine producerende cellen sterven af. De vermindering van deze neurotransmitters leidt tot een verstoorde elektrische activiteit van de hersenen, voornamelijk in de basale ganglia. Naast de motorische symptomen zijn patiënten vaak ook depressief en vertonen cognitieve stoornissen.

Corticale informatie voor zowel motoriek, cognitie als emotie wordt gedaan binnen de basale ganglia. Het doel van het voorgestelde onderzoek is om meer inzicht te krijgen in de mechanismen waarop de verschillende neurotransmittersystemen (dopamine en serotonine) de cortico-basal ganglia informatie verwerking beïnvloeden. Dit onderzoek is een uitbreiding van een eerdere proef (DEC 2010-189) waarbij enkel gekeken werd naar de respons van de STN (één van de basale kernen).

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

De ziekte van Parkinson is een veel voorkomende neurodegeneratieve aandoening onder oudere leeftijdsgroepen (>50 jaar). Het aantal patiënten zal de komende jaren toenemen met de veroudering van de maatschappij.

Tot op heden is er geen genezende therapie voor de ziekte van Parkinson voor handen. Dit betekent dat patiënten in eerste instantie aangewezen blijven op symptoombestrijding door medicatie en later door chirurgie. Voor Parkinson patiënten biedt dit onderzoek verder inzicht in de effecten van de verschillende neurotransmittersystemen op de informatie verwerking in de basale ganglia. De resultaten kunnen nieuwe aanwijzingen bieden voor verbetering van de huidige farmacologische en chirurgische behandelmethoden voor zowel de motorische, cognitieve als depressieve symptomen.

3. Alternatieven

Voor het voorgestelde onderzoek bestaat helaas geen alternatief. Om de (functionele) relatie tussen de corticale afferenten van de basale ganglia en de cortico-basale ganglia circuit adequaat te bestuderen zijn proefdieren noodzakelijk. Er wordt uitvoerig gekeken naar de neuronen onder depletie van de diverse neurotransmitters en er vindt stimulatie van meerdere corticale gebieden plaats. Een dergelijk experiment is bij mensen medisch en ethisch gezien dan ook niet te verantwoorden.

Daarnaast is het gebruik van *in vitro* modellen uitgesloten. In een *in vitro* model zijn corticale stimulaties en registraties van in een intact hersennetwerk niet mogelijk.

4. Ethische afweging

De ziekte van Parkinson is een degeneratieve ziekte van het centrale zenuwstelsel. Patiënten die lijden aan deze ziekte zijn voor het leven afhankelijk van medicatie en later van chirurgie, omdat een

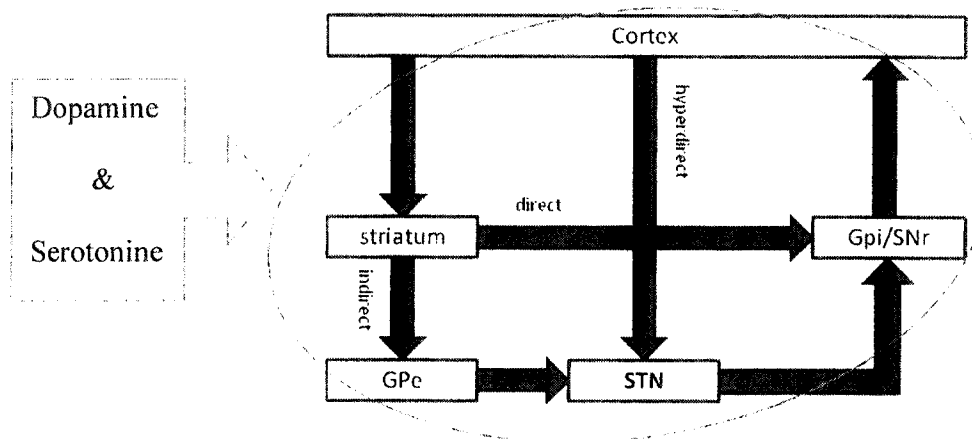
curatieve therapie nog niet voor handen is. De ziekte, met name in een vergevorderd stadium, is zeer belemmerend in het dagelijks leven en langdurig medicatie gebruik gaat gepaard met heftige bijwerkingen. Buiten dat de pathologie van deze hersenaandoening nog niet volledig bekend is, bestaan er voor deze aandoening ook geen curatieve behandelingen. Het gebruik van deze proefdieren, met het te verwachten ongerief, wordt gerechtvaardigd door het belang van dit onderzoek.

4 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Kenmerkend voor *ziekte van Parkinson* is het verlies aan dopamine neuronen in de substantia nigra, maar ook een vermindering van serotonerge cellen in de dorsale raphe is aanwezig. Het tekort aan dopamine leidt tot een abnormale activiteit van de basale ganglia, het effect van de veranderingen in het serotonerge systeem zijn nog niet geheel duidelijk, maar speelt ook een rol op zowel de cognitieve, depressieve als motorische symptomen.

Het cortico-basale ganglia-thalamocorticale circuit is onder meer betrokken bij de regulatie van de motoriek, cognitie en emoties. Verstoring van de normale activiteit wordt vooral gezien door de verstoring in de motoriek en komt bij PD tot uiting in symptomen zoals hypokinesie en rigiditeit. (zie figuur 1)



Figuur 1

Zowel dopamine als serotonine hebben een modulerend effect op de corticale-basal ganglia informatie processing in de verschillende kernen van de basale ganglia middels inhiberende en exciterende receptoren. Welk netto effect serotonine en dopamine hebben, kan middels dit experiment gemeten worden aan de hand van de veranderingen in latentietijden en amplitude van de responsen gemeten in de verschillende structuren van de basale ganglia tijdens corticale stimulatie.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Onze studie is positief beoordeeld door peer-review commissies van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO). En de studie wordt als zodanig door deze instantie gefinancierd: (NWO).

Dit DEC voorstel is bekeken en positief beoordeeld door

en . Deze onderzoekers hebben ruime ervaring met experimenteel onderzoek op het gebied van de ziekte van Parkinson.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

Voor het experiment zullen we gebruik maken van mannelijke Sprague-Dawley ratten (circa 10 weken oud; Charles River). Dezelfde stam is gebruikt voor eerdere experimenten gerelateerd aan dit project. Aan het einde van het experiment zullen de ratten worden opgeofferd en de hersenen worden gebruikt voor verdere immunohistochemische en morfologische analyse.

7b. Sexe

In dit experiment zullen mannelijke ratten gebruikt worden. De korte oestrogeen cyclus van vrouwelijke ratten kunnen de neurotransmittersystemen beïnvloeden. In mannelijke ratten is de hormoon huishouding stabiel en de data zal minder onderlinge variatie vertonen.

7c. Aantallen

Voor dit voorgestelde experiment zullen vier groepen worden aangevraagd van verschillende groepsgrootte. In het experiment zal gebruik worden gemaakt van een controle groep en drie interventie groepen: dopamine depletie, serotonine depletie en dopamine-serotonine depletie.

Gedrags experimenten

In eerdere vergelijkbare studies hebben we gevonden dat de effectgrootte 19% was en dat de spreiding 15% was (2007-003). Als we de power calculeren:

$$N = 15.7 * (0.15/0.19)^2 = 9.78 = 10 \text{ ratten per groep}$$

Electrofysiologie

Op basis van de literatuur en onze eerdere experimenten met lesie modellen (5,7-DHT en 6-OHDA) en electrophysiologietesten wordt een effect verwacht van 10% (δ), een spreiding van 20% (σ), een significantie van 0.05 (α) en power van 80% (π).

In het bijzonder worden de parameters voor de powerberekening gebaseerd op eerder onderzoek van onze groep in samenwerking met de Universiteit Bordeaux waarin dezelfde electrophysiologische technieken door de uitvoerend onderzoeker zijn geleerd. Tevens wordt verwezen naar DEC 2008-145 waarin dezelfde electrophysiologie technieken werden gebruikt als voorgesteld in dit onderzoek. Als uitleesparameter wordt gebruikt gemaakt van een zogenaamde peristimulus tijd histogram (PSTH). Neuronale responsen gemeten in de experimentele groep afgezet worden ten opzichte van de sham groep middels een PSTH.

Hieruit volgt dat het aantal neuronen per groep, per nucleus (4, namelijk Gpe, Gpi, SNr, striatum) zal bestaan uit:

$$N = 15.7 * (0.20/0.10)^2 = 62.8$$

Op basis van eerder experimenten is gebleken dat gemiddeld 10 neuronen gemeten kunnen worden per rat. Om voldoende neuronen te hebben betekent dit dat per groep 6.28 ratten nodig zijn om voldoende neuronen te verkrijgen.

Daarnaast verwachten we op basis van eerdere experimenten verwachten we door de chirurgische interventie een uitval van 10% en van lesies een verlies van circa 35% (DEC 2010-031). Het verlies in de lesie groep is een combinatie van het verlies door de operatie en de uitval postoperatief door

de depletie van de neurotransmitters. De dieren eten en drinken minder goed en de darmmotiliteit is verlaagd. Dieren worden dagelijks gewogen en zo nodig bijgevoerd om het verlies te beperken.

Dit betekent dat een experimentele groep bestaat uit:

Sham: $6.28/0.9 = 6.98$, dus 7/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 7 = 28$ dieren voor de sham groep

Lesie groepen: $6.28/0.65 = 9.66$, dus 10/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 10 = 40$ dieren per laesie groep.

Experiment:

Sham groep: N=28

6-OHDA: N=40

5,7-DHT: N=40

6-OHDA +5,7-DHT: N=40

In al deze groepen zullen 10 ratten per groep gebruikt worden voor de gedragsexperimenten, de overige ratten zullen enkel gebruikt worden voor de electrofysiologische experimenten.

Aangezien niet alle ratten tegelijk in experiment hoeven te gaan zal na het recorden van 30, 40 en 50 neuronen per nucleus, per groep een interim analyse worden gedaan om het aantal proefdieren zo veel mogelijk te beperken

7 Dierproef

8. Experiment

In deze studie wordt gekeken naar de basale ganglia responsen op corticale stimulatie bij 6-OHDA laesies en/ of 5,7-DHT lesies in de rat. Het 6-OHDA model is een veel gebruikt model voor Parkinson onderzoek met ratten. In dit experiment maken we gebruik van het unilaterale medial forebrain bundel 6-OHDA injecties. Voor de serotonine depletie wordt gebruik gemaakt van het 5,7-DHT model, waarbij het serotonine systeem gedepleert wordt middels intra-DRN injectie van 5,7-DHT (zoals in DEC 2010-024, 2009-095, 2010-189)

Het doel van dit experiment is om de cortico-subthalamische informatie procesingen bij dopaminerge en/ of serotonerge depletie te evalueren middels gedragstaken en electrofysiologie. Derhalve zullen de ratten in de volgende 4 groepen worden ingedeeld:

1. Sham
2. 6-OHDA
3. 5,7-DHT
4. 6-OHDA + 5,7-DHT

Hierbij resulteert een 6-OHDA injectie in een unilaterale dopamine depletie en 5,7-DHT injectie in een serotonine depletie en in de 4^{de} groep ratten een combinatie hiervan.

Gedragstaken

De effecten van de lesies op de motorische en het non-motorische gedrag zullen worden geevalueerd aan de hand van de open field test, zero maze, home cage emergency, CatWalk.

Electrofysiologie procedure

Drie tot vier weken na de leasies zullen de ratten wederom in diepe anesthesie worden gebracht. Dit om de electrofysiologische metingen te verrichten, waarbij de extracellulaire neuronale activiteit wordt gevisualiseerd en vervolgens opgeslagen op een computer voor latere off-line data-analyse. Synchroon aan de registratie van de extra-cellulaire activiteit van een Gpe, Gpi, SNr of striataal neuron, zullen meerdere malen de MC en de mPFC gestimuleerd worden met een enkele stroomstimulus. Op deze manier kunnen meerdere registraties worden uitgevoerd in de verschillende kernen. Aan het eind van een registratie sessie zal de laatste registratie plek worden gemarkeerd door middel van een electroforetische injectie van Pontamine Sky blue door middel van een negatieve stroom van 20 μ A over de glas microelectrode (zoals in DEC 2008-145, 2008-126, 2010-189).

Operatie procedure

Alle operatieve handelingen (intracraniele elektroden en/of canule implantatie en intracerebrale injecties) worden verricht onder aseptische omstandigheden.

Einde experiment

Na het maken van de electroforetische injectie zal de rat transcardiaal geperfundeerd en opgeofferd worden. De perfusie zal verricht worden met paraformaldehyde in 10-15 minuten. Het brein wordt vrijgemaakt en geprepareerd voor histologisch en immunohistochemisch onderzoek.

Schematisch overzicht experimenten

Vorbereiding	Operatie	Postoperatief herstel	Gedragstesten	Electrofysiologie	Einde	Analyse
Habituatie ratten	Lesie	21 dagen	2 wk	1 dag	Perfusie- fixatie	Histochemie / Immunocytochemie

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De eerste operaties voor de injecties van saline, 6-OHDA en/ of 5,7-DHT zullen plaats vinden onder algehele narcose. We zullen gebruik maken van het inhalatie anestheticum isofluraan (4% voor inductie, 2,5% voor het onderhouden). Ratten worden in een box geplaatst, voor de inductie van anesthesie. Hierna worden ze in een anesthesie-masker geplaatst, om de anesthesie te onderhouden. Aangezien het perioost wordt ingesneden op de schedel en de rat in de oorpinnen van het stereotact zit, zal tevens lokaal lidocaine worden toegediend (DEC 2008-145, 2008-126). Postoperatief zullen de ratten buprenorfine krijgen (0.01mg/kg s.c. LG) krijgen voor adequate pijnstilling

Voor de *electrofysiologische experimenten* (operaties) zullen de ratten opnieuw onder diepe anesthesie worden gebracht, ditmaal gebruikmakend van urethaan 1,5 g/kg L.G (i.p). Indien nodig zal de sedatie worden onderhouden met een gelijke oplossing. Het betreft hier een (terminaal) experiment waarbij de effecten (van het anestheticum) op de fysiologie zo minimaal mogelijk dienen te zijn, omdat dit van invloed kan zijn op de (electro)fysiologische eigenschappen van de hersenkernen / neuronen voor registratie. Met deze redenen is gekozen voor urethaan waarvan bekend dat het weinig effect heeft op de fysiologie.

9b. Pijnbestrijding

In de klinische situatie worden elektroden onder lokale anesthesie ingebracht. Hierbij ondervinden patiënten nauwelijks pijn waardoor ook er geen behoefte bestaat aan analgetica. Soms is er behoefte aan postoperatieve pijnbestrijding. Bij de proefdieren gebeurt dit onder algehele anesthesie en locale toepassing van lidocaine op potentieel pijnlijke plekken en pre-operatief gift buprenorphine (0.01-0.05 mg/kg s.c. LG elke 8-12h) Om eventuele postoperatieve pijn te bestrijden zal zo nodig buprenorfine toegediend worden. Wanneer post operatief het vermoeden bestaat dat een rat nog steeds pijn heeft, zal een extra gift buprenorfine toegediend worden.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

De dieren zijn aan het einde van de proef nog onderdiepe anesthesie (urethaan) en worden perfusie-gefixeerd met formaldehyde (DEC 2008-015, 2007-184, 2007-028). Indien tijdens de proef een dier ernstig ziek wordt of significant lijdt agv van het experiment of door een andere oorzaak (infectie, tumor etc.), dan zal het dier euthanasie ondergaan middels CO₂/O₂ vergassing (humane eindpunten). Meer specifiek voor dit experiment zal er intensief gelet worden op gewichtsverlies, welke gerelateerd is aan een intracerebrale neurotoxine injectie (bijv. 6-OHDA, 5,7-DHT). Indien er gewichtsverlies optreedt (meer dan 20%) en langer persisteert dan 96h, duidt dit op significant verslechtering en zal er een humaan eindpunt toegepast worden. Het gewicht zal derhalve nauwlettend gemonitord worden door de ratten regelmatig te wegen. 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

Mate van ongerief van lesies is vergelijkbaar met de ziekte van Parkinson. De injectieprocedure vindt plaats onder algehele narcose waarbij periost wordt aangedaan. **Ondanks adequate (postoperatieve) pijnstilling is er sprake van ernstig peri-operatief ongerief (5).** In het experiment zullen drie groepen ratten een unilaterale dopamine en/of serotonine depletie model (het leven met Parkinson) ondergaan, dit zal naar verwachting matig ongerief met zich meedragen (4). De electrophysiologie zal matig ongerief met zich teweeg brengen ivm de intraperitoneale injectie van urethaan (4). De gedragsexperimenten zorgen voor mild ongerief (2). Samenvattend kan verondersteld worden dat de experimenten matig/ernstig ongerief voor de dieren veroorzaken (4), behalve bij de operatie welke ernstig ongerief is (5). De sham groep en de dieren die geen gedrags experimenten ondergaan zullen dus gedurende het experiment minder ongerief ondergaan (zie tabel)

Procedure	Duur van ongerief	Mate van ongerief			
		Sham	Sham zonder gedrag	Experimenteel met gedrag	Experimenteel zonder gedrag
Injectie 6-OHDA/5.7-DHT, saline	1 dag	5	5	5	5
Leven met parkinson	3-4 weken	NVT	NVT	4	4
Gedragsexperimenten	<1h per dag gedurende 2 weken	2*	NVT	2*	NVT
Intraperitoneale injectie	<1 min	4	4	4	4
Electrophysiologie	1 dag	0	0	0	0

*10 ratten per groep

10b. Welzijnsevaluatie

In de eerdere experimenten is met ook gelaedeerde ratten (5,7-DHT en 6-OHDA) gewerkt. In dit experiment werken we met zowel gelaedeerde als normale ratten. De verwachting is dat de uitkomst in dit experiment gelijk zal zijn als in de voorgaande experimenten en het welzijn zal dagelijks worden bijgehouden met een welzijnsdagboek en regelmatige monitoring van gewicht en gedrag.

11. Verzorging en huisvesting

De dieren zullen gepaard worden gehuisvest. Er is geen reden om de ratten individueel te huisvesten. De ratten hebben vrije toegang tot voeding en water.

12. Deskundigheid

Het experiment zal worden uitgevoerd door personen die ruime ervaring hebben met dit soort onderzoek. De betrokken personen zijn bevoegd volgens art. 9. Het uitvoeren van elektrofysiologische experimenten is door de onderzoekers VO en VVO reeds in meerdere experimenten uitgevoerd in samenwerking met experts (uit Oxford en Bordeaux) op het gebied van elektrofysiologie, basale ganglia en serotonerge systeem.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

- Stereotactische operatie SOP
- Electrofysiologische recordings SOP
- Perfusie SOP

- Urethaan SOP
- Gedragstaken SOP

Relevante literatuur

- Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V. The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol.* 2005 Aug;76(6):393-413. Epub 2005 Oct 24. Review.
- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA. Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res.* 1990 Apr 9;513(1):43-59.
- Magill, P.J., Sharott, A., Bevan, M.D., Brown, P., Bolam, J.P., 2004. Synchronous unit activity and local field potentials evoked in the subthalamic nucleus by cortical stimulation. *Journal of neurophysiology* 92, 700-714.
- Kita H, Kita T. Cortical stimulation evokes abnormal responses in the dopamine-depleted rat basal ganglia. *J Neurosci.* 31(28):10311-22.

SOP perfusie

19 november 2007

Te gebruiken oplossingen

- Tyrode
- 4% Paraformaldehyde in fosfaatbuffer 0.1M

De rat is reeds in diepe anesthesie (urethaan)

- o Geen reactie op pijnprikkel.

- Bij adequate anesthesie wordt de rat geïnstalleerd op de perfusie opstelling.
- De buikwand wordt geopend.
- Het diafragma wordt geopend en het hart wordt gecanuleerd in de linkerventrikel.

Vervolgens wordt gedurende 3-4 minuten gespoeld met 150ml Tyrode om het bloed te vervangen en de kleine vaten te dilateren. Daarna wordt overgestapt naar 4% paraformaldehyde, minimaal 600ml. De hele procedure duurt 12-15 minuten.

- De canule wordt geplaatst in de linkerventrikel.
 - o Start perfusie met Tyrode.
 - o Rechter atrium wordt geopend.
 - o Let op adequate verbleking van de lever en longen.
- Na perfusie met Tyrode, start perfusie met 4% Paraformaldehyde.
 - o Let op gele verkleuring van extremiteiten en ingewanden.
- 4% Paraformaldehyde perfusie laten lopen.
- Einde Perfusie.
- Brein collectie
 - o Decapitatie
 - o Schedel openen voor brein collectie.
 - o Brein in 4% paraformaldehyde voor post fixatie gedurende 2 uur.
 - o Gevolgd door sucrose 10%, 20% en 30% over de volgende dagen voor invriezen.

Standard Operating Procedure: Stereotactische operatie / Electrofysiologische recordings

Gebaseerd op SOP-PSY01 (v

Inleiding

Indien een onderzoeksvraagstelling verlangt dat een gedefinieerde kern in de rattenhersen chemisch of farmacologisch wordt geprikkeld, of dat er een afleiding van hersenpotentialen wordt gemeten, kan dit worden gedaan met behulp van stereotactische procedures. De rattenhersen zijn in kaart gebracht (e.g., Paxinos & Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press: Sydney, 1986). Nadat de kop van de rat in de gewenste positie in de stereotakter 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 rat 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 stereotakter ('stereotactic frame') genoemd.

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

De mate van ongerief is 2 (gering tot matig, een terminaal experiment onder narcose).

NB. Alle genoemde procedures zijn beschreven voor de rat, maar gelden uiteraard ook voor de muis.

Anaesthesie en analgesie bij operatie

De stereotactische operatie wordt onder algehele narcose uitgevoerd. Om de rat onder narcose te krijgen wordt ze een injectie gegeven van urethaan (1,5 g/kg, i.p.). Een eenmalige injectie zal voldoende zijn om de rat gedurende een periode van uren onder narcose te houden. Voordat de rat in de stereotakter gefixeerd wordt, dient de reflex die optreedt na het knijpen in de tenen verdwenen te zijn. 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.

Apparaat en procedures

De haren op de hoofdhuid worden afgeschoren en verwijderd. Daarna wordt de rat in de stereotakter gezet. Met behulp van twee stompe oorpennen, die in de gehoorgang van de rat gebracht worden, en een bekklem voor de snijtanden, wordt de kop van de rat 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 gedesinfecteerd in alcohol. De huid wordt zodanig gefixeerd dat de schedel goed bereikbaar is. Daarna wordt de schedel schoon en droog gemaakt met steriel 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 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 tevoren vastgestelde dorsoventrale coördinaat.

Plaatsen van elektrodes

Middels de stereotactische operatie kunnen de registratie (micro)elektrodes, (glaspipetten) geleidelijk in de hersenen worden geplaatst, die het mogelijk maken de hersenactiviteit te meten (i.e., single cell / EEG). De (micro)elektrodes dienen op een van tevoren bepaalde plaats in het brein te worden gebracht. De (micro)elektrodes worden verbonden met het recording systeem (AlphaLab Pro, AlphaOmega) voor online visualisatie van het recordingsignaal (single cell recording, local field potential, EEG). Data wordt opgeslagen op een personal computer voor latere offline data-analyse.

Standaard Operating Procedure

Gebruik van Urethaan

FHML_0002

(o-Ethyl carbamaat)

Een algemene SOP die van toepassing is voor het gebruik van urethaan als anaestheticum in terminale experimenten bij proefdieren.

Naam laboratorium

NVT

Ruimte nummer

NVT

Instituut/Afdeling/vakgroep

NVT

Naam verantwoordelijk onderzoeker

NVT

Onderwerp

De SOP beschrijft de veiligheidsprocedures voor het gebruik van Urethaan als anaestheticum bij knaagdieren.

Laatste Revisie datum

April 2009

Opgesteld door RHVK

Inleiding

Voor het gebruik van chemische stoffen in het bijzonder CMR stoffen is het interne beleid dat als onderdeel van de DEC procedure op basis van de gegevens die door de onderzoeker worden vermeld in aan het werkprotocol gehechte bijlage B: "werken met toxische stoffen", een toestemming onder voorwaarden vereist is.

Urethaan wordt veelvuldig gebruikt als 'one-shot' anaestheticum. Om bureaucrativering van het instrument "toestemming onder voorwaarden", te voorkomen in het toegestaan om Urethaan als anaestheticum toe te passen als verwezen wordt naar deze SOP.

Echter, iedere afwijking van deze vastgestelde SOP moet worden beschreven in werkprotocol bijlage B, toxische stoffen werken met CRM stoffen en hierop is onverkort een toestemming onder voorwaarden van toepassing. **Urethaan** wordt alleen of in combinatie met andere stoffen gebruikt om proefdieren te verdoven. Urethaan staat er om bekend dat het een langdurige stabiele anesthesie met minimale fysiologische veranderingen te weeg brengt.

Urethaan is een bewezen carcinogeen bij ratten en muizen en heeft mutagene eigenschappen.

Urethaan is een carcinogeen en mag alleen gebruikt worden met speciale rechtvaardiging voor het gebruik en alleen in terminale (acute) procedures

Fysische eigenschappen

Urethaan (CAS 51-79-6) komt voor als kleurloze kristallen of korrelig poeder en is weinig oplosbaar in olijfolie, oplosbaar in water, ether, glycerol en chloroform. Bij 25°C, is 1gr urethaan oplosbaar in 0,5gr water. Bij kamertemperatuur is Urethaan vluchtig en bij 103°C gaat Urethaan over in gasfase; toxische gassen en stikstofoxides. Urethaan is bijna reukloos. Er is geen geurdrempel voor Urethaan vastgesteld.

Gezondheidsrisico's – Toxiciteit

Urethaan is door de Europese Unie als categorie 2 carcinogeen geclassificeerd. **Urethaan** heeft carcinogene eigenschappen in ratten en muizen en heeft mutageen eigenschappen in muizen. Humane data zijn niet voorhanden. Urethaan is in vivo en in vitro genotoxisch. Urethaan is carcinogeen in muizen, raten en hamsters.

Urethaan heeft een **huidnotatie** en wordt snel door de huid opgenomen. Urethaan heeft effecten op meerdere organen, onderdrukt de vorming van bloedcellen, passeert de placenta, induceert de vorming van tumoren in foetussen in utero blootgesteld en initieert preneoplastische veranderingen in de huid.

De publieke gezondheidkundige grenswaarde is in Nederland vastgesteld op 0,002mg/m³ TGG-8u.

Zwangere vrouwen mogen niet met urethaan werken, dienen elk contact (direct en indirect te vermijden).

De mogelijke opname routes zijn:

- longen (inademing van aerosolen, gassen),
- oraal (hand-mond contact)
- huidcontact (direct contact, besmette oppervalkten).



Bij het gebruik van urethaan als anaestheticum dient men daarom de volgende maatregelen te nemen, met specifieke aandacht voor huidcontact om het risico van blootstelling te minimaliseren:

Voorzorgsmaatregelen, persoonlijke beschermingsmiddelen.

- Een veiligheidsbril of gelaatsscherp moet gedragen worden als er mogelijk contact mogelijk is met urethaan (bijv. door spatten, dampen). Persoonlijke bescherming door een veiligheidsbril is altijd nodig bij het werken met urethaan. Een normale bril zonder zijkapjes is NIET afdoende.

Het dragen van contactlenzen bij het werken met urethaan is niet toegestaan

- Veiligheidsdouche en oogdouche. In de onmiddellijke nabijheid van de werkplek dient een er een nooddouche en oogdouche beschikbaar te zijn. Oogspoelstations (flessen) zijn niet toegestaan.
- Een lab-jas, gesloten schoenen en een lange broek moet gedragen worden als men urethaan gebruikt. Beschermende kleding dient gebruikt te worden om huidcontact met urethaan te voorkomen.
- Bij het hanteren van urethaan maar ook van proefdieren die verdoofd zijn met urethaan, en hierbij mogelijk contact met bloed, serum en urine¹, dienen handschoenen gedragen te worden. Nitril wegwerphandschoenen (NitraTex®) of met verlengd manchet (NitraTex® EP) zijn hiervoor geschikt.

Speciale maatregelen

- Als Urethaan in kristallijn of poedervorm wordt gebruikt en/of wordt opgelost dient men een veiligheidsbril en handschoenen te dragen.
- Het contact met kristallijn of poedervormig urethaan dient voorkomen te worden. Om inademing van de vluchtige stof te voorkomen is het gebruik van urethaan **als poeder** (inwegen en/of andere handelingen) en/of bij het oplossen/verwarmen alleen toegestaan als de handelingen worden uitgevoerd in een **biohazardkast type II B**.
- Injecteren van proefdieren gebeurt bij voorkeur in een zuurkast. Indien dit niet mogelijk is dient om aerosolvorming te voorkomen de naald tijden het injecteren met een tissue afgedekt te worden. (tissue behandelen als gecontamineerd)

¹ Als referentie. In 2 uur tijd wordt in de muis Urethaan geklaard indien Urethaan wordt opgelost in water. Dit betekent dat er snel metabolieten worden gevormd. Urethaan metabolieten zijn epoxides die het DNA kunnen aantasten. M.a.w. men moet tijdens het experiment oppassen dat men niet wordt blootgesteld aan urine (druppels).

- Plaats nooit de beschermhuls na gebruik terug over de naald (niet recappen), of gebruik veilige naaldsystemen. Dit om het risico op een prikaccident te verkleinen.

Speciale procedures en bewaar condities

- Open houders met urethaan zijn verboden.
- Eenmaal opgelost dient urethaan in een gesealde fles (infuusfles) te worden bewaard. Dit voorkomt het vrijkomen in de lucht (vervluchtigen), morsen en het door een incident verontreinigen van de werkomgeving.
- Indien er grotere hoeveelheden kunnen vrijkomen (< 300 ml) dient een absorptiemiddel aanwezig te zijn in het laboratoria. (type nog vast te stellen bijv.: Spill X-S -op bases van koolstof)

Afvalverwijdering

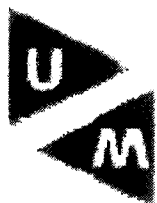
- Teveel aan urethaan, in gesealde fles (zie hierboven) en alle vast afval (incl. dierlijke bijproducten) gecontamineerd met urethaan dient afgevoerd te worden in de blauwe WIVA vaten (als zogenoemd ziekenhuisafval)
- Karkassen worden op de hiervoor van toepassing zijn wijze aangeboden aan het CPV (neem hiervoor contact op met de stable manager.
- Werkplek wordt na gebruik afgenomen met water. Schoonmaak middelen worden als gecontamineerd materiaal behandeld.

Calamiteit: wat te doen? Noodprocedures

- Als een spil groter is dan 300ml dient de werkplek verlaten te worden. Bel _____ en informeer de bedrijfshulpverlening (BHV) betreffende het voorval en om welke stof het gaat. Volg de instructies van de BHV.
- Bij een contact met de huid, ogen of andere slijmvliezen, spoel de gecontamineerde plek met veel water.

SOP Gedragstaken

- **Open Field Test (OF):** OF test is performed to measure spontaneous locomotor and exploratory activity in rats (Blokland et al 2002). The OF test is conducted in a square, clear Plexiglas box (100 cm × 100 cm × 30 cm), with an open top and a dark floor. The arena of the OF is subdivided in 'corner' (four squares each 16 cm × 16 cm), 'wall' (four rectangles each 16 cm × 64 cm) and 'center' (one square 64 cm × 64 cm) zones. The OF is placed on the floor of an experimental room. A camera is installed 2.5 m above the center of the field. Immediately after a rat is placed in the center of the OF, the movements and position of the animals are recorded and registered automatically by a computerized system (EthoVision, Noldus Equipment, The Netherlands). Only the total duration of rearing and leaning (i.e. rearing but making contact with the forepaws against the wall) are manually recorded. The illumination of the room is reduced to 60 lx on the floor of the apparatus. Testing will be carried out on 4 consecutive days. The floor of the OF is cleaned with a damp sponge after each session, which lasts 5 min, to prevent transmission of olfactory cues. OF behavior is tested between 13:30 and 17:00 h.
- **Zero Maze:** The zero-maze, as originally described in Shepherd et al. (1994), is made of black plastic (transparent for infrared light). It consists of a circular runway (98 cm in diameter, 10 cm path width, 70 cm above floor level) which divided equally into two opposite open and two opposite parts enclosed with 50 cm high side walls. A 7 mm high edge surrounds the open parts to prevent falls. A rat is placed into one of the open parts facing a closed part and allowed to explore the maze over a period of 5 min. Total and relative duration and distance travelled in open and enclosed parts are measured under low loght conditions (1-2 lux) via an infrared video camera connected to a video tracking system (Ethovision Pro, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). The maze is thoroughly cleaned with water after each animal. All testing is carried out between 07:30 and 12:30 h.
- **Catwalk Gait analysis:** The Catwalk method is a gait analysis that allows easy quantitation of a large number of locomotion parameters during crossing a walkway (Hamers et al., 2001). The animals traverse a walkway (plexiglass walls, spaced 8 cm apart) with a glass floor located in a darkened room. The principle of this method is based on a special optical technique. The light of a fluorescent tube is completely internally reflected in the (standard) glass walkway floor. When the animal crosses the walkway the light leaves the glass and illumates one the areas of contact. In this way paw contacts are visualized. Signals are digitized and stored on a personal computer for off-line analysis.



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: 043

Uw referentie:

Onze referentie:

Maastricht, 26-10-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing*", is op de DEC vergadering van 21 oktober 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

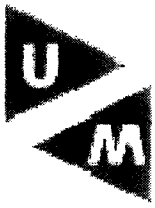
- De DEC verzoekt bij punt 4, het stuk tekst vanaf "Met dit experiment, dat ernstig ongerief veroorzaakt, enzovoort" te verwijderen.
- Punt 7c- De DEC verzoekt de uitleesparameters te specificeren.
- Punt 7c- De DEC merkt op dat de berekening van de groepsgroottes incorrect is:
sham per nucleus: $6.28/0.9 = 6.98$, dus 7/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 7 = 28$ dieren voor de sham groep
laesie per nucleus: $6.28/0.65 = 9.66$, dus 10/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 10 = 40$ dieren per laesie groep. De DEC verzoekt de aantallen aan te passen (inclusief op voorblad).
- 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. De DEC verzoekt het leven met Parkinson ook te vermelden. De DEC merkt op dat het ongerief van de shamgroep minder is en daarom in een aparte kolom op het voorblad vermeld dient te worden.

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 2011-134, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM



Aan: DEC MUMC

Maastricht, 31 oktober

Betreft: projectaanvraag: "*Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing*" (DEC 2011-134)

Geachte

Hierbij zend ik u de aanpassingen in de projectaanvraag zoals door u verzocht in uw brief van 26 oktober j.l. Hieronder kort een toelichting op de door u genoemde punten:

- * De DEC verzoekt bij punt 4, het stuk tekst vanaf "Met dit experiment, dat ernstig ongerief veroorzaakt, enzovoort" te verwijderen.
 - o Tekst is verwijderd.
- * Punt 7c- De DEC verzoekt de uitleesparameters te specificeren.
 - o Ik begrijp niet exact wat u wilt. Mijn interpretatie was dat ik moest aangeven wat ik 'meet' met de electrophysiologie. Heb hier dan ook een zin voor toegevoegd.
- * Punt 7c- De DEC merkt op dat de berekening van de groepsgroottes incorrect is:
sham per nucleus: $6.28/0.9 = 6.98$, dus 7/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 7 = 28$ dieren voor de sham groep
laesie per nucleus: $6.28/0.65 = 9.66$, dus 10/nucleus, 4 nuclei dus $4 \times 10 = 40$ dieren per laesie groep. De DEC verzoekt de aantallen aan te passen (inclusief op voorblad).
 - o Gewijzigd als verzocht, inclusief voorblad.
- * 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. De DEC verzoekt het leven met Parkinson ook te vermelden. De DEC merkt op dat het ongerief van de shamgroep minder is en daarom in een aparte kolom op het voorblad vermeld dient te worden.
 - o Tabel toegevoegd. Leven met Parkinson is, als reeds in de tekst aangegeven, ook opgenomen in de tabel. Sham groep is nog steeds als aparte kolom op het voorblad vermeld.

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en hopende op een positief oordeel van de projectaanvraag.

Met vriendelijk groet,

From:
Sent: vrijdag 4 november 2011 10:47
To:
Subject: FW: Project 2011-134-w
Attachments: DEC Cx-BG 5HT depletion.doc; reactie op brief DEC 2011-134.doc

Geachte onderzoeker, beste

De DEC heeft de herziene bekeken en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen:

Punt 7c: uitleesparameter. Elektrofysiologische test is te algemeen. In 8 staat beschreven dat de *de extracellulaire neuronale activiteit* wordt geanalyseerd. Is deze meting de basis voor de sigma en delta genoemd bij 7c? Als ja: dan *de extracellulaire neuronale activiteit als uitleesparameter* bij 7c vermelden.

Punt 10 tabel:

Er staat: De sham groep en de dieren die geen gedragsexperimenten ondergaan, zullen dus gedurende het experiment minder ongerief ondergaan.

Wat is minder ongerief (03, 04)? Wat is het totale ongerief in de shamgroep en dieren die geen gedragsexperimenten ondergaan? Dit moet duidelijk zichtbaar zijn in (aparte) tabellen, waarbij aard, duur en frequentie per groep wordt aangegeven. NB1 de shamgroep heeft op het voorblad ongerief 05, NB2 ook al gebeuren de electrofysiologische testen onder anesthesie, er is enig ongerief door bv inductie en onder anesthesie houden, (ongerief kan niet 0 zijn).

De DEC verzoekt je bovenstaande punten nog aan te passen.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk secretaris

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200 MD Maastricht T 043
E-mail:

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

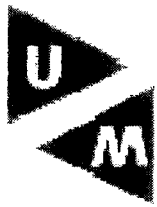
From:
Sent: maandag 31 oktober 2011 12:37
To:
Cc:
Subject: Re: Project 2011-134-w

Beste Mevr. ,

Hierbij de aangepaste projectaanvraag en de brief aan de DEC waarin alle wijzigingen zijn beschreven.

Hartelijke groet,

4-11-2011



Aan: DEC MUMC

Maastricht, 7 november

Betreft: projectaanvraag: "*Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing*" (DEC 2011-134)

Geachte

Hierbij zend ik u de aanpassingen in de projectaanvraag zoals door u verzocht in uw brief van 4 november j.l. Hieronder kort een toelichting op de door u genoemde punten:

- Punt 7c: uitleesparameter. Elektrofysiologische test is te algemeen. In 8 staat beschreven dat de *de extracellulaire neuronale activiteit* wordt geanalyseerd. Is deze meting de basis voor de sigma en delta genoemd bij 7c? Als ja: dan *de extracellulaire neuronale activiteit als uitleesparameter* bij 7c vermelden.
 - Tekst is als verzocht aangepast. De uitleesparameter is een zogenaamd peristimulus tijdhistogram.
 - Punt 10 tabel: Er staat: De sham groep en de dieren die geen gedragsexperimenten ondergaan, zullen dus gedurende het experiment minder ongerief ondergaan. Wat is minder ongerief (03, 04)? Wat is het totale ongerief in de shamgroep en dieren die geen gedragsexperimenten ondergaan? Dit moet duidelijk zichtbaar zijn in (aparte) tabellen, waarbij aard, duur en frequentie per groep wordt aangegeven.
 - Tabel is aangepast, zodat het ongerief voor de dieren die geen gedragsexperimenten ondergaan overzichtelijker is voor de lezer.
- NB1 de shamgroep heeft op het voorblad ongerief 05.
- Dat is dus correct. Op het voorblad dient de ernstigste mate van ongerief gedurende een experiment te worden weergegeven. Voor de sham groep is dat in dit experiment 5.
- NB2 ook al gebeuren de electrofysiologische testen onder anesthesie, er is enig ongerief door bv inductie en onder anesthesie houden, (ongerief kan niet 0 zijn).
- Dit klopt, daarom wordt ook het ongerief van de intraperitoneale injectie voor de inductie van de anesthesie gescoord met een ongerief van 4. Een lege artis anesthesie brengt vervolgens geen ongerief meer met zich mee.

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en hopende op een positief oordeel van de projectaanvraag.

Met vriendelijk groet,

From: ..
Sent: donderdag 10 november 2011 9:33
To: ..
Subject: FW: Project 2011-134-w
Attachments: reactie op 2de brief DEC 2011-134.doc; DEC Cx-BG 5HT depletion.doc



reactie op 2de DEC Cx-BG
rief DEC 2011-134 depletion.doc

Geachte onderzoeker, beste

De DEC heeft de herziene versie opnieuw bekeken.
De beantwoording van punt 7c is in orde.

Over punt 10a heeft de DEC toch nog een vraag:

- De injectieprocedure vindt plaats onder algehele narcose (waarbij perioest wordt aangedaan). Dit kan gezien worden als ernstig ongerief (5). Is dit zo? En waarom is ongerief 05 bij algehele narcose?

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie
MD Maastricht T 043

E-mail:

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

Postbus 616-UNS 50-Box 48, 6200

-----Original Message-----

From: ..
Sent: maandag 7 november 2011 11:03
To: ..
Subject: RE: Project 2011-134-w

Beste Mevr. ,

hierbij de aangepaste versie van het onderzoeksprotocol en de begeleidende brief.

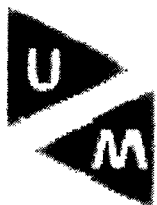
hartelijke groet,

From: ..
Sent: Friday, November 04, 2011 10:47 AM
To: ..
Subject: FW: Project 2011-134-w

Geachte onderzoeker, beste

De DEC heeft de herziene versie bekeken en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen:

Punt 7c: uitleesparameter. Elektrofysiologische test is te algemeen. In 8 staat beschreven dat de extracellulaire neuronale activiteit wordt geanalyseerd. Is deze meting de basis voor de sigma en delta genoemd bij 7c? Als ja: dan de extracellulaire neuronale activiteit als uitleesparameter bij 7c vermelden.



University Maastricht

Aan: DEC MUMC

Maastricht, 10 november

Betreft: projectaanvraag: "*Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing*" (DEC 2011-134)

Geachte

Hierbij zend ik u de aanpassing in de projectaanvraag zoals door u verzocht in uw mail van 10 november j.l. Hieronder kort een toelichting op uw vraag:

- Punt 10 a: De injectieprocedure vindt plaats onder algehele narcose (waarbij periost wordt aangedaan). Dit kan gezien worden als ernstig ongerief (5). Is dit zo? En waarom is ongerief 05 bij algehele narcose?
 - Ik heb hiertoe een verklarende zin in de tekst toegevoegd. Wij zijn van mening, met de ervaring die wij hebben met deze ingreep, dat ratten de ratten met name post-operatief ernstig ongerief hebben. Dit is duidelijk te observeren aan hun gedrag. Als u van mening bent dat er sprake is van minder ongerief, dan willen wij dit uiteraard graag naar beneden bijstellen.

Met vriendelijk groet,

Aan: 2 10 3

Ons kenmerk

Doorkiesnummer
043-

Maastricht
10-11-2011

Project: *Effecten van depletie van dopamine en serotonine op de cortico-basal ganglia information processing.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariat DEC-UM
T (043) :

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-134
Diersoort: rat
Aantal dieren: 148
Einddatum: 10-11-2015

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

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

Vicevoorzitter DEC-IUM