

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
nr.	document NTS 20171327	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS oud			x					
3	NTS nieuw	x							
4	Projectvoorstel			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 1 en 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 1 en 2 nieuw			x					
7	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
8	DEC advies				x		x	x	
9	Verzoek en antwoord aanvullende informatie				x		x	x	
10	Mail verzoek en antwoord aanvullende informatie				x		x	x	
11	Mail verzoek en antwoord aanvullende informatie DEC				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

11 APR. 2017



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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 border="1"> <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 border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 29</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, [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 29	Postbus	9101, [redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29																
Postbus	9101, [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 border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[redacted]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input 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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[redacted]		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[redacted]																
Afdeling	[redacted]																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[redacted]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input 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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[redacted]		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[redacted]																
Afdeling	[redacted]																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 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 | 0 8 . 0 5 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 7 . 0 5 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Alzheimer's disease and hyperactivity
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer
- 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? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Leges
 Wijziging € Leges
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies en 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	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	07 - 04 - 2017
Handtekening	

Format**Niet-technische samenvatting**

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer
- 1.2 Looptijd van het project | 8-5-2017 - 7-5-2022
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Alzheimer, farmaceutische manipulatie, epilepsie

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Er lijden per jaar 48 miljoen mensen aan de ziekte van Alzheimer, een ernstige geheugenstoornis. Dit aantal zal waarschijnlijk toenemen tot 130 miljoen in 2050. Momenteel is het alleen mogelijk om de symptomen te bestrijden en bestaat er geen behandeling die de oorzaken van deze ziekte bestrijdt. Er zijn aanwijzingen dat hersenen van mensen met de ziekte van Alzheimer te makkelijk geprikkeld zijn, net zoals bij mensen met epilepsie. Wij zullen netwerken van hersencellen bestuderen die betrokken zijn in geheugenprocessen en analyseren of er sprake is van abnormale activiteit zoals die ook bij epilepsie optreedt. Ook verdiepen we ons in de effectiviteit van nieuwe behandelingen voor patiënten met epilepsie, zoals geneesmiddelen en elektrische stimulatie. We onderzoeken of die ook geschikt zijn om te voorkomen dat het geheugen achteruit gaat.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	De uitkomst van dit onderzoek zal helpen de ziekte van Alzheimer eerder te detecteren met behulp van biomarkers (electroencephalography en magnetoencephalography). Ook zullen de resultaten van het onderzoek mogelijk bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor Alzheimer die de oorzaken van de ziekte aanpakken, zoals betere geneesmiddelen en diepe hersenstimulatie.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	We zullen maximaal 1170 muizen gebruiken. licht ongerief 34 % matig ongerief 36% ernstig ongerief 30 %
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Transgene dieren zouden ongerief kunnen hebben vanwege epileptische aanvallen. Dieren zullen chirurgische ingrepen ondergaan die nodig zijn voor het implanteren van apparatuur voor het meten en beïnvloeden van neurale activiteit. Geïmplanteerde dieren moeten individueel worden gehuisvest om schade te voorkomen aan het implantaat en andere negatieve gevolgen voor het welzijn van het dier. Dieren zullen gedragstaken uitvoeren waarbij het ongerief licht zal zijn.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het ongerief zal matig zijn voor alle dieren.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? Dieren zullen gedood worden na afloop van de experimenten zodat de hersenen onderzocht kunnen worden.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. Deze experimenten zijn ontworpen om hersenactiviteit aan cognitie en gedrag te koppelen. Om deze redenen zijn levende dieren nodig. De beschikbare data zijn niet voldoende om deze wetenschappelijke vragen te beantwoorden met behulp van computermodellen.

4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. We gebruiken technologieën met een hoog rendement waardoor we veel data per dier kunnen verzamelen en het aantal benodigde dieren beperkt blijft. We zullen niet meer dieren gebruiken dan noodzakelijk om betrouwbare conclusies te kunnen trekken.

4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersmodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. Muizen worden gebruikt omdat het de kleinste, genetisch aanpasbare, zoogdieren zijn waar dit onderzoek in mogelijk is. We maken gebruik van extra kleine implantaten die zo min mogelijk invloed hebben op het welzijn en de bewegingsvrijheid van het dier.
De technieken die wij gebruiken zijn zeer modern en verfijnd.

4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. Alle operaties worden uitgevoerd met de beste werkmethoden op het gebied van anesthesie, pijn management en post-operatieve zorg. Ook houden wij dagelijks de gezondheid en het welzijn van de dieren in de gaten en huisvesten we de dieren in een verrijkte omgeving. Wanneer een dier meer ongerief heeft dan toegestaan voor dit onderzoek dan zal het worden gedood om onnodig lijden te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

**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.	Alzheimer's disease and hyperactivity

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
		<input checked="" 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.
-

Alzheimer's disease (AD) related dementia, memory disorder, affects 48 million people globally each year. This number will almost double every 20 years estimated to reach 130 million Alzheimer patients by 2050 (1). Devastatingly current treatments are only able to alleviate the symptoms but not to provide permanent cure emphasizing the importance of finding novel treatment targets and biomarkers for more accurate and earlier detection and treatment of the disease.

Novel exciting findings have raised the possibility that Alzheimer disease could actually be caused by abnormal excitatory neuronal activity leading to cognitive and behavioral deficits common in AD (2-4). Clinical observations support this idea that such abnormal activity may play role also in the AD patients. It has been shown that patients with strong familiar genetic risk of AD (mutations in presenilin-1, presenilin-2, or the amyloid precursor protein, or with duplications of wild-type amyloid precursor protein) also express even tenfold risk of epileptic seizures and patients with non-familial (inheritance of apolipoprotein E4) form of AD are more prone to express induced seizures(5). Importantly, this hyperactivity can be observed at the early stage of the disease, already at the Mild Cognitive Impairment (MCI) stage being one the earliest clinical biomarkers of the pathology. This form of neuronal hyperactivity can be observed in EEG as epileptiform activity including simple parietal, complex parietal or generalized seizures with wide range of behavioural changes such as single limb shaking, altered consciousness, speech arrest and /or atony (6). However, it should be noted that AD linked hyperactivity has been also showed in MCI patients in the hippocampal area by using functional magnetic resonance imaging (fMRI) (7). Importantly, antiepileptic drug levetiracetam is able to decrease observed hyperactivity and slightly improve the memory decline at this stage both in patients and in animal models (7,8). Even though these highly exciting and promising results, these findings can only be considered as preliminary leaving a lot of open question. More studies are needed to resolve e.g. which brain areas are most susceptible to hyperactivity, which subtypes of neurons are affected by hyperactivity or /and are the locus of epileptic activity, what are the mechanisms of efficient antiepileptic drugs and could hyperactivity be controlled by other more efficient methods?

In this project we investigate the link between the abnormal single cell and neuronal activity, and memory and cognitive deficits in mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (AP^{dE9}) (9). Because of mutations these mice develop amyloid plaques beginning at 4-5 months of age and show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age (10,11). Interestingly, these mice show increase in epileptic seizures even before

actual amyloid plaque accumulation in the age between 3 and 4.5 months reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity implying this neuronal network be first one affected by the accumulating amyloid load (4). Therefore, in this project we will characterize how hyperactivity and epileptiform activity related to amyloid pathology affects the two memory-related networks, the corticothalamic and the intra-hippocampal networks in single cell and in neuronal network level. Based on the characterization we will try to provide causal evidence on the link between hyper excitability and cognitive decline by using pharmacological, pharmacogenetical, optogenetical stimulation and electrical or ultrasound stimulation. To summarize, the focus of this project is to characterize the link between electrical activity and memory. This is an aspect of AD that has been so far under investigated.

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?

The main objectives of this research are

1.

Categorize how hyperactivity and epileptiform activity related to amyloid pathology affects the two memory-related networks, the corticothalamic and the intra-hippocampal networks in single cell and in neuronal network level. This is done in young animal (3-4 months) and in old animals (12-18 months). The young animals are more prone to even severe epileptiform hyperactivity but the cognitive decline is only detectable in older animal, mimicking closely clinical findings.

2. To reverse observed hyperactivity in these networks and characterize the unknown mechanisms of action pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical manipulation and/or electrical stimulation.

3. Based on the results of previous work packages we will conduct behavioral tests to verify that suppression of pathological hyperactivity improves cognitive functions.

This project is a coherent continuum of our previous work concentrated on hyperactivity in AD animal models, and this project is supported by extensive co-operation by other international groups having years of experience on this specific issue and working with animals (3,4,11). Additionally, the lab is qualified to carry out this research project, based on our track record of producing significant advance in this field, our ability to use the most advanced techniques (12-14). We propose a plan of closely related experiments, involving neural recordings and perturbation of neural activity in awake, behaving rodents. Furthermore, we are continuously working at improving our experimental technology, in collaboration with bioengineering and neuroengineering groups. This in order to obtain, larger, more precise data sets to best address the specific research questions in this project, and to improve animal welfare.

3.3 Relevance

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

Alzheimer's disease related dementia, memory disorder, affects 48 million people globally each year, and the number of patients are estimated to reach 130 million Alzheimer patients by 2050. Devastatingly current treatments are only able to alleviate the symptoms but not to provide permanent cure. So, there is desperate need to develop and identify novel targets for treatments but also biomarkers, e.g. EEG and/or MEG markers, allowing earlier detection of the disease.

Overall this project concerning the hypo- or/and hyperactivity of single neurons and aberrant network activity related to progressive amyloid pathology provides a ground breaking platform to identify novel biomarkers (epileptiform activity detected by EEG or MEG) for early detection of AD in patients but also for innovative disease-modifying targets. However, the findings will also benefit the field of epilepsy research by providing novel mechanisms of epileptogenesis in the medial temporal lobe and cortico-thalamic related pathologies. In addition, the proposed intracranial electrical stimulation provides a novel mechanisms of clinical deep brain stimulation currently being tested as for a treatment for AD.

3.4 Research Strategy

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

The research project will consist in a set of neurophysiological, behavioral and manipulation experiments in amyloid expressing transgenic and wild type control mice. For the most part animals will be awake during the experiments, and engaged in behaviors that entail the encoding, or the retrieval of memories (equivalent to what would be called in humans 'declarative memories'). Experiments will also follow neural activity sleep and other inactive behavioral, in order to characterize the memory consolidation phase.

We aim at collecting a data set on neural activity during memory acquisition, consolidation and retrieval, linking the neural circuit level to cognitive performance, and representing the basis for a new theory of cognitive decline related to progressive amyloid pathology. Additionally, the neural activity is related to the efficacy of the treatments to reveal potential new drug targets and novel biomarkers.

Animal model for amyloid related Alzheimer pathology

The hypotheses will be tested with mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (AP^{dE9}) mutations which develop amyloid plaques beginning at 3-4 months of age without memory dysfunction. These animals show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age when these animals also suffer from severe amyloid plaque burden (9-11). These mice show increase in epileptic seizures between 3 and 4.5 months of age reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity (4). Therefore, studying the young animals may lead to the detection of early EEG biomarkers for early stages of AD, and studies with older animals to the characterization of the pathology of the cognitive loss.

Based on our previous studies and other literature we will concentrate on the two memory-related networks, the corticothalamic e.g. sensory cortex – reticulate thalamic nucleus - thalamus and the hippocampal-cortical networks e.g. entorhinal cortex – hippocampus -subiculum. These neuronal networks are also prone to hyperactivity and amyloid pathology in this animal model (4,9,15–18).

Experimental techniques will consist of the following components, which will provide complementary data on the same research data:

Measurement techniques

- Massive extracellular electrophysiology for recording large ensembles of neurons in multiple areas, to characterize and decode the precise temporal structure of neural network activity. This allow simultaneous observations in single cell and neuronal network level to determine the state and locus of hyperactivity and the effect and mechanisms of treatments.
- Calcium imaging enables to sample even larger number of single cell activity in specific brain areas, albeit with lesser temporal resolution.
- Large scale characterization of global brain activity with e.g. electrocorticography for detecting electrical activity in multiple cortical areas

Interventional techniques

- Optogenetical controlling of specific subpopulations of neurons with millisecond temporal scale
- Pharmacological and chemogenetic approaches allowing specific control of neurotransmitter systems to control hyperactivity
- Electrical deep brain stimulation to control and restore of activity in neuronal networks

Behavioral techniques

- Automated mazes and behavioral setups for freely moving experiments
- Head fixed virtual reality

These methods will be employed in combination (or sometimes as alternative to find out the best experimental setup) in order to address the research questions delineated above.

The experiment will be sub-divided in a number of groups of relatively small size (actual group size will be determined by power analysis, but each group will usually have a max. size of 20).

Group sizes will be kept small thanks to the large yield in recorded neurons allowed by our techniques.

Techniques for readout and manipulation of brain activity

To study how these complex, brain-wide patterns of activity link to memory, behavior and related pathologies, it is necessary to get a handle on the activity of large numbers of neurons spread throughout the brain, and to manipulate them with large degree of specificity. In the last years, there has been an explosion of new techniques that allow us to observe neural activity, and to manipulate brain activity at unprecedented scale and resolution. These techniques constitute the 'toolbox' of a modern systems neuroscience laboratory, and are applied singularly, or most productively, in creative combinations.

The techniques the laboratory has experience with and we intend to apply in this project, in different combinations are:

Readout technologies:

- CMOS based silicon probes. These probes are manufactured in silicon with techniques similar to those used to make computer chips. They are intensively miniaturized and they enable recording of electrical potential from a large number (up to thousands) of sites in the brain, while maintaining a form factor that is still compatible with comfortable use even in mice.
- Flexible support electrode arrays. These electrode types, similar to those used in human (e.g. epileptic) patients, enable novel recording configurations, for example from a large number of cortical sites with ElectroCorticoGraphy (ECoG) grids.
- Calcium imaging of neural activity. By combining genetically encoded calcium indicators (GCamp proteins) expressed by viral transfection, and advanced microscopy techniques (such as two-photon microscopy) it is possible to record the activity of thousands of neurons, albeit at a time resolution slower than what is allowed by electrophysiology. Recently, miniaturized 'wearable' microscopes have been devised that enable use in freely-moving mice.

Activity Manipulation Techniques

- Optogenetics. By genetically inserting (via a viral transfection) light-sensitive molecules in the neuronal membrane, it is possible to control neural activity of specific neuronal population in a very precise way.
- Electrical stimulation. Delivering mild electrical deep brain stimulation it is possible to balance the observed hyperactivity of neuronal tissue in millisecond scale
- Pharmacology. Antiepileptic and/or hyperactivity reducing drugs affect to the brain areas affected by AD pathology and restore abnormal neuronal activity
- Advanced pharmacology. Viral vectors can also be used to express in selected neural populations designer receptors (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, DREADDs), that are activated by designer drugs (molecules that are not normally present in the brain). These chemogenetical methods enable long-lasting, specific manipulations of certain neuronal populations and their activity.

These techniques will be employed in the context of:

- Behavioral tasks. The severity of AD pathology and the efficacy of manipulations are determined in behavioral task sensitive to amyloid pathology and effects of manipulations.
- Novel behavioral paradigms. An example of innovation in this field is the 'Virtual reality' setup where rodents are head fixed but can run on a track ball, or wheel, or other device while projection screens and other sensory stimulation devices provide the illusion of moving in a virtual environment. Animal can be tested with bulkier setups (e.g. microscopes) that do not lend themselves to implant in freely-moving animals.

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.

The project has 3 major workpackages based on the objectives (see also section 3.2.). Each workpackages of the experiment is optimized by utilizing the results of the previous stage allowing us to enhance the workflow of the project. The three major workpackages (see table 1). The experiments are conducted in male mice. The scope of this research is not in the role of hormonal effect on the AD pathology. Because there is gender differences in amyloid burden accumulation and overall AD pathology is strongly linked to the fluctuation in the estrous cycle, we won't use female mice (24, 25).

1) To detect the neuronal activity animals are implanted during anesthesia with a carrier for electrodes for electrophysiological recordings, or with a lens allowing calcium imaging. Mice are implanted during anesthesia with electrodes allowing to observe electrical activity of single neurons and neuronal network activity in targeted brains areas related to memory and cognitive functions. Young (3-4 months) and old (12-14 months) AD mice, and age matched wild type controls are chronically implanted during anesthesia with electrodes allowing to observe electrical activity of single neurons and neuronal network activity in targeted brains areas related to memory and cognitive functions. After recovery period the animals are allowed to move freely in their home cages while video EEG is recorder.

2) Animals are subjected to pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical or electrical manipulation to restore and/or prevent abnormal neuronal activity. In the goal two the aim is to characterize the mechanism of action of different treatments for AD related hyperactivity. The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg), or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (7,8,19). Alternatively, intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (20). Optogenetical manipulation is achieved by injecting viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel. Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (21). Ultrasound stimulation of brain areas will be achieved by an integrated focused ultrasound system was used (22). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (23).

3)

The efficacy of treatment is determined by behavioral tasks sensitive to amyloid pathology but also to the effects of treatments. To accelerate learning a behavioral task and facilitate motivation of the animal, (partial) food or water restriction may be required. Animals will be weighed regularly and weight is maintained at ~85% of its original weight. We also compare the animals' weight with a normal growth curve to make sure an animal is maintaining a healthy weight. The animals receive 1.5-2.5 gram (~1 pellet) per day when it's on food restriction. This is excluding the amount of food the animal receives as a reward, which will vary according to the animals' performance

Table 1. The project is coherent entity aiming to reveal the neuronal mechanism behind hyperactivity as a primary mechanism of Alzheimer's disease. At the WP1 (workpackage) animals are equipped with electrophysiological or calcium imaging equipment allowing us to record individual neurons and neuronal activity of populations of neurons. At the WP2 state-of-art manipulation methods aimed to control hyperactivity is being used and their mechanisms of action is characterized. Finally at the WP3 the progression of the disease and the efficacy of manipulations is determined in behavioral tasks.

WP	Objective	Methods		Go and no-go
1	Characterization of abnormal neuronal activity in cortico-thalamic and cortico-hippocampal networks	Implantation (only one method will apply per animal)	Electrode carrier Lenses for calcium imaging	Basic characterization. NA
2	Reverse observed hyperactivity and characterize the main target of the treatment	Manipulation (only one method will apply per animal)	Pharmacological <ul style="list-style-type: none"> • Acute i.p. levetiracetam • Chronic s.c levetiracetam • Acute i.p. clonazepam Advanced pharmacology - pharmacogenetics Electrical deep brain stimulation Optogenetics Ultrasound	<ul style="list-style-type: none"> - We choose the target brain area and manipulation based on the results of the WP1 - If a manipulation proves to be not efficient, other manipulation will apply
3	Verify the improvement of cognitive function	Behavioral task (only one method will apply per animal)	Freely moving animals Head fixed animals	<ul style="list-style-type: none"> - We choose the manipulation to be tested based on the results of the WP2

As described, we make use of freely moving and head-fixed virtual reality behavioral settings. These are described in distinct appendices because of their different animal welfare profiles. Again, these techniques are both necessary as they present specific advantages, as described in the

appendices. Briefly, head fixed setup allow us to use bulkier equipment which could not be implanted permanently on the animal's head. Also virtual reality setups enable more flexible behavioral contexts than what's possible in real environments. On the other hand, some specific types of memory, for example for space, physical objects, social recognition memory, require to be tested in freely-moving animals.

We breed the APdE9 line in-house. Breeding is done to provide animals for both experimental procedure, and will be performed jointly with another research group. In order to maintain the transgenic mouse line, breeding will start with wild type females (C57Bl6j, commercially available) and 24, 4-12 months old transgenic APdE9 males (from the lab animal facility). We will obtain around 130 mice in the first year, of which based on the previous breeding results we will obtain 80 transgenic (40 males and 40 females), and 50 wild type mice (15 males and 35 females). Because of an expected 20% loss of animals, because of epilepsy, we will be left with around 32 new transgenic breeding males. The procedure will be repeated in the following years of the project in order to obtain a sufficient number of animals. Altogether, for the breeding over 5 years we will need 400 (5x80) APdE9 transgenic mice. The animal are used for breeding purpose only until they reach age of 14 month of age after which they will be used as a late stage experimental group in the experiment. This allows us to reduce the amount animals needed to be bred for the old stage experiments, and this technique has been successfully deployed in the lab. The use of only male breeders is justified because this mouse line is maintained as a heterozygous genotype: homozygous animals have no survival chance, because the homozygous mutation makes females infertile. Heterozygous females have low fertility and do not take care of their offspring. Therefore, we need to breed with heterozygous males and WT females. Therefore, we estimate to use 400 transgenic animals for breeding purposes depending on their breeding capabilities, and, additionally, we will use a maximum of 770 mice (each group including transgenic and control subjects), altogether 1170 mice. We note that, because of high yield, we may obtain strong statistical power with considerably smaller groups.

The animal are used for breeding purpose only until they reach age of 14 month of age after which they will be used as a late stage experimental group in the experiment. This allows us to reduce the amount animals needed to be bred for the old stage experiments, and this technique has been successfully deployed previously.

The use of only male breeders is justified because this mouse line is maintained as a heterozygous genotype: homozygous animals have no survival chance, because the homozygous mutation makes females infertile. Heterozygous females have low fertility and do not take care of their offspring. Therefore, we need to breed with heterozygous males and WT females.

Therefore, we estimate to use 400 transgenic animals for breeding purposes depending on their breeding capabilities, and, additionally, we will use a maximum of 770 mice (each group including transgenic and control subjects), altogether 1170 mice. We note that, because of high yield, we may obtain strong statistical power with considerably smaller groups.

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

The different parts in this project will be closely intertwined, and they will look at different components of the neural circuits and manipulations, and will be based on the previous steps. The research project will consist in a set of neurophysiological, behavioral and manipulation experiments in Alzheimer's disease modeling amyloid expressing transgenic and wild type control mice aiming to reveal the neuronal mechanisms of amyloid related hyperactivity. To achieve this aim different pharmacological and other manipulation methods are applied to AD transgenic animal model mice

(APdE9) and their non-transgenic control littermates while neuronal activity is recorded by electrophysiological or calcium imaging methods. The efficacy and mechanism of treatments are verified by behavioral tests. Also they will look at different levels the effects of manipulation on neuronal and neuronal network levels and correlate it with performance in cognitive tasks to reveal how amyloid related pathology interfere with these processes (see fig. 1).

	PROCEDURE 1								PROCEDURE 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<u>Injection of viral vectors</u>					●	●	●	●		●	
<u>Implantation of electrodes</u>	●	●	●	●	●				●	●	●
<u>Implantation of lens (2 oper.)</u>						●	●	●			
<u>Drug therapy</u>						●			●		
- Acute levetiracetam i.p.	●										
- Chronic levetiracetam s.c.		●									
- Acute clonazepam i.p.			●								
<u>Electrical / ultrasound stimulation</u>				●							●
<u>Optogenetics / advanced pharmacology</u>					●	●	●	●		●	
<u>Behavioral task freely moving animals</u>	●	●	●	●	●	●	●	●			
<u>Behavioral task head fixed animals</u>									●	●	●
<u>Number of animals (tg + ctrl)</u>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
- Young (2-5 m)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
- Old (11-14 m)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35

Figure 1. A detailed description of individual animal groups and workflow. Different pharmacological and other manipulation methods are applied to AD transgenic animal model mice (APdE9) and their non-transgenic control littermates while neuronal activity is recorded by electrophysiological or calcium imaging methods. The efficacy and mechanism of treatments are verified by behavioral tests.

Bibliography

1. WHO. World Alzheimer Report [Internet]. 2015 [cited 2016 Sep 14]. Available from: <http://www.worldalzreport2015.org/downloads/world-alzheimer-report-2015.pdf>
2. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2007 Sep 6;55(5):697–711.
3. Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, et al. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3453–62.
4. Gurevicius K, Lipponen A, Tanila H. Increased cortical and thalamic excitability in freely moving APPswe/PS1dE9 mice modeling epileptic activity associated with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex N Y N 1991*. 2013 May;23(5):1148–58.
5. Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009 Apr;66(4):435–40.
6. Vossel KA, Beagle AJ, Rabinovici GD, Shu H, Lee SE, Naasan G, et al. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2013 Sep 1;70(9):1158–66.
7. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. 2012 May 10;74(3):467–74.
8. Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vossel KA, Orr AG, Cirrito JR, et al. Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 16;109(42):E2895-2903.
9. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*. 2004 Jan 15;13(2):159–70.
10. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, et al. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*. 2006 Dec;24(3):516–24.
11. Minkeviciene R, Banerjee P, Tanila H. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Nov;311(2):677–82.
12. Battaglia FP, Sutherland GR, McNaughton BL. Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical "up-state" transitions. *Learn Mem*. 2004 Nov;11(6):697–704.
13. Peyrache A, Battaglia FP, Destexhe A. Inhibition recruitment in prefrontal cortex during sleep spindles and gating of hippocampal inputs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 11;108(41):17207–12.
14. Holleman E, Battaglia FP. Memory Consolidation, Replay, and Cortico-Hippocampal Interactions. In: Tatsuno M, editor. *Analysis and Modeling of Coordinated Multi-neuronal Activity* [Internet]. Springer New York; 2015 [cited 2016 Sep 17]. p. 207–21. (Springer Series in Computational Neuroscience). Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-1969-7_10
15. Dhenain M, El Tannir El Tayara N, Wu T-D, Guégan M, Volk A, Quintana C, et al. Characterization of in vivo MRI detectable thalamic amyloid plaques from APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*. 2009 Jan;30(1):41–53.

16. Darvesh S, Cash MK, Reid GA, Martin E, Mitnitski A, Geula C. Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jan;71(1):2–14.
17. Beenhakker MP, Huguenard JR. Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy? *Neuron*. 2009 Jun 11;62(5):612–32.
18. Destexhe A, Contreras D, Steriade M. Mechanisms underlying the synchronizing action of corticothalamic feedback through inhibition of thalamic relay cells. *J Neurophysiol*. 1998 Feb;79(2):999–1016.
19. Busche MA, Kekuš M, Adelsberger H, Noda T, Förstl H, Nelken I, et al. Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci*. 2015 Nov;18(11):1623–30.
20. Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M, Zugaro M. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci*. 2016 Jul;19(7):959–64.
21. Packer AM, Roska B, Häusser M. Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nat Neurosci*. 2013 Jul;16(7):805–15.
22. Leinenga G, Götz J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Transl Med*. 2015 Mar 11;7(278):278ra33.
23. Zhu H, Pleil KE, Urban DJ, Moy SS, Kash TL, Roth BL. Chemogenetic inactivation of ventral hippocampal glutamatergic neurons disrupts consolidation of contextual fear memory. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2014 Jul;39(8):1880–92.
24. Wang J, Tanila H, Puoliväli J, Kadish I, van Groen T. Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2003
25. Yue M, Hanna A, Wilson J, Roder H, Janus C. Sex difference in pathology and memory decline in rTg4510 mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging*. 2011

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	Circuit manipulations in behaving, head-fixed mice
2	Circuit manipulation in freely moving mice

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 1	Type of animal procedure Circuit manipulations in behaving, head-fixed mice

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.

The aim of this experiment will be to investigate brain dynamics in the brain areas linked to amyloid related hyperactivity and interacting areas, during memory and sensory dependent behaviors.

Experiments with awake, head-fixed mice are an important complementary method to freely moving and anesthetized preparations. Whereas freely moving animals allow for more complex naturalistic behaviors, head-fixed experiments have several important advantages:

By fixing the animal's position within an experimental setup and restricting it in its behavioral repertoire (while still allowing to perform the behaviors of interest), precise description of the animal's behavior and location is facilitated enormously. In addition, exact sensory stimulation is made possible. This stimulation could for example be real objects that are presented to the animal, or virtual stimuli such as images and scenes on a screen, or controlled stimulation of the rodent's whiskers. To leverage the natural behavior of rodents to run around while interacting with their environment, we will usually combine head-fixation with a mechanism that allows the rodent to perform walking and running movements while being fixated. These mechanisms can, for example, be (spherical) treadmills, wheels, or air suspended platforms that the rodent can move to create the illusion of running. In combination with a virtual reality setup, this additionally allows to create experiments in which the rodents can interact with huge, practically infinitely large environments, making it possible to assess complex forms of memory guided behavior.

A second advantage of head-fixed animals is the possibility to use more complex neural recording techniques – most imaging techniques, for example, require the animal to be still while an image is acquired. Semi-acute electrophysiological recordings, in which the recording electrodes are inserted into the brain in each session significantly decrease the time and complexity of preparatory surgeries (thus reducing the animal's discomfort and increasing success rate) while giving the freedom to easily adjust electrode position between experimental sessions and thereby increasing the yield of neural measurements.

Ultimately the goal of using these state of the art recording techniques in combination with methods to manipulate neural activity during memory dependent tasks is to infer causal relationships between neural activity and memory performance.

The primary outcome measurements of these experiments are:

1. Measurements of behavioral performance of head-fixed mice during various memory and sensory related tasks including test of sensory memories, spatial memories and object memories (in a virtual reality environment). For instance, memory testing will be performed in a head-fixed,

virtual reality version of the Morris Water Maze, where APP-PS1 are known to be impaired and, pharmacological treatments are known to have a partial rescue effect. Our pilot studies show that mice can learn maze tasks quite effectively in this kind of setup. Parameters such as percent correct, latency to response, confusion matrix (which responses are measured with which stimuli) will be measured. Animal motion will be measured by sensing the movement of the track ball, treadmill or wheel that supports the animal. Additional bodily parameters such as ECG, or pupil diameter, gaze direction (by infrared camera) may be measured in non-invasive fashions.

2. Electrophysiological recordings of local network (single cell & neural ensemble) and global network level (local field potentials, EEG) activity in a network of memory related brain structures such as the hippocampus, entorhinal cortex or sensory areas such as barrel cortex and connected thalamic areas in awake head-fixed rodents that perform memory related tasks, to obtain fine time resolution measures of memory-related brain activity

3. Calcium and voltage-sensitive dye imaging measurements with two-photon microscopes and mini-cameras to obtain high throughput (hundreds of neurons simultaneously monitored), medium-time (10-100 ms) resolution monitoring of neural activity in a network of memory related structures in awake head-fixed mice that perform memory related tasks.

4. Optogenetic, pharmacogenetic and pharmacological perturbation of neural functioning, in combination with imaging or recording of neural activity in the same or related brain structures and/or analysis of behavioral changes during the perturbation. This could for example be optogenetic stimulation of neurons, or pharmacological blockade of a specific neurotransmitter in mice that perform a memory guided sensory discrimination task.

5. Use of electrophysiological and optical imaging techniques as well as optogenetic/ electrical /ultrasound manipulations in a network of memory related structures in anesthetized animals, for characterization of basic network properties, independent of behavior

6. *Ex-vivo* Histological measures of gene expression, concentrations of relevant chemicals (e.g. neuromodulators, neurotransmitters), neuroanatomy, validation of implant placement.

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

Animals will be accommodated to the housing facilities following the usual procedures in our facility. To motivate the natural running behavior of rodents, which is essential for experiments in which running is required, the animals will be provided with additional cage enrichment, for example in the form of running wheels, toys, or objects to explore, unless this is deemed unnecessary or detrimental to animal welfare, based on observation of subject behavior.

Preparation and Surgery:

For behavioral experiments, at the beginning of each experiment the animals have to undergo a surgery including different steps depending on the group

- head-post (for head restraint) implant
- Implantation of optic fibers
- the preparation of craniotomies or the implantation of electrodes to ensure target brain areas are accessible for later recording sessions
- implantations of cranial windows
- Implantation of microendoscopic lenses
- the injection of viral vectors for calcium/voltage sensitive dye and optogenetic / pharmacogenetical studies

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3) separate stereotactic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors, for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This can be combined with the head-post implantation but not with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies. In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope

In general, we will strive to minimize the number of surgeries necessary.

Animals that undergo viral injections need to remain in quarantine in independently ventilated cages for a 1-3 week periods, according to GGO regulations.

Manipulations

Animals are subjected to pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical or electrical manipulation to restore and/or prevent abnormal neuronal activity. In the goal two the aim is to characterize the mechanism of action of different treatments for AD related hyperactivity. The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg), or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (7,8,19). Alternatively, intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (20). Optogenetical manipulation is achieved by injecting viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel. Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (21). Ultrasound stimulation of brain areas will be achieved by an integrated focused ultrasound system was used (22). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (23).

Training/ Recordings

Behavioral experiments: All tasks used are of an appetitive nature. Training is done gradually and with positive reinforcement to support the animals' habituation to the training/recording setup and task.

Initially, animals are habituated to restraint and to head fixation, and then trained in the specific task of interest. Animals might be mildly food or water restricted to motivate behavioral performance of the animal with food or fluid. All food restricted animals will be monitored closely to ensure sufficient food intake. To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly.

Training continues between 1 day and several weeks (max. 12 weeks with an animal) for more complex tasks but generally until a certain behavioral criterion is reached (e.g. 70% trials correct in 1 session). Sessions usually last between 30 minutes and 2-3 hours per day, where care is taken to only continue the session while the animal is accepting the head fixation.

During semi-acute and acute electrophysiological recording sessions, electrodes are inserted into the brain structures of interest and recordings are performed. Due to the lack of sub-dural pain receptors, mice usually take very little notice of this procedure even without anesthesia and analgesia. Optical imaging can usually be done by placing the imaging microscope or mini camera over the previously prepared imaging area and don't require additional invasive procedures.

Recording session, electrical and optical, will take place daily, either after behavioral criterion is reached, or during training, depending on the task.

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

Animals will be accommodated to the housing facilities following the usual procedures in our facility. To motivate the natural running behavior of rodents, which is essential for experiments in which running is required, the animals will be provided with additional cage enrichment, for example in the form of running wheels, toys, or objects to explore, unless this is deemed unnecessary or detrimental to animal welfare, based on observation of subject behavior.

Preparation and Surgery:

For behavioral experiments, at the beginning of each experiment the animals have to undergo a surgery including different steps depending on the group

- head-post (for head restraint) implant
- Implantation of optic fibers
- the preparation of craniotomies or the implantation of electrodes to ensure target brain areas are accessible for later recording sessions
- implantations of cranial windows
- Implantation of microendoscopic lenses
- the injection of viral vectors for calcium/voltage sensitive dye and optogenetic / pharmacogenetical studies

Under certain circumstances it will be necessary to put the animal under anesthesia to repair or improve the efficiency of the implant.

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3 e.g. head post implantation + injection of viral vectors + implantation of optic fibers) separate stereotactic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors, for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This can be combined with the head-

post implantation but not with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies. In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope

In general, we will strive to minimize the number of surgeries necessary.

Animals that undergo viral injections need to remain in quarantine in independently ventilated cages for a 1-3 week periods, according to GGO regulations.

Manipulations

The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg) or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (29,30,42). Intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (11). Optogenetical manipulation is achieved by injecting once viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel (12). Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (13). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration once or several times of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (13).

Training/ Recordings

Behavioral experiments: All tasks used are of an appetitive nature. Training is done gradually and with positive reinforcement to support the animals' habituation to the training/recording setup and task.

Initially, animals are habituated to restraint and to head fixation, and then trained in the specific task of interest. Animals might be mildly food or water restricted to motivate behavioral performance by rewarding the animal with food or fluid reward. All food restricted animals will be monitored closely to ensure sufficient food intake. To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly. We have tried it before with rats and mice. If rats start to argue the implant is among the first thing they bite. We saw it and there was pieces bit off from the head implant. Also with mice we have had the same issues. Since it is impossible to prevent the fighting and nibbling it is too risky to keep 2 animals in the same cage. Even one bite can destroy (reference or ground) the whole recording system and consequently I need to sacrifice the animal.

Training continues between 1 day and several weeks (max. 12 weeks with an animal) for more complex tasks but generally until a certain behavioral criterion is reached (e.g. 70% trials correct in 1 session). Sessions usually last between 30 minutes and 2-3 hours per day, where care is taken to only continue the session while the animal is accepting the head fixation.

During semi-acute and acute electrophysiological recording sessions, electrodes are inserted into the brain structures of interest and recordings are performed. Due to the lack of sub-dural pain receptors, mice usually take very little notice of this procedure even without anesthesia and analgesia. Optical imaging can usually be done by placing the imaging microscope or mini camera over the previously prepared imaging area and don't require additional invasive procedures.

Recording session, electrical and optical, will take place daily, either after behavioral criterion is reached, or during training, depending on the task.

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

For each experimental group, the number of animals will be assessed by power analysis. Power analysis will take into account the high yield in terms of recorded cells of our methodologies. For each measure, the appropriate N number will be selected, which may be number of animals, or number of recorded neurons, or number of electrodes, etc. Because these are novel procedures, some pilot experiments will be needed to assess the effect sizes before a proper analysis can be performed. When possible we will use data from similar experiments in the literature for an initial guess of the effect sizes. Number of animals will be increased to allow for dropout due to non-functioning implants, problems at surgery, or other causes of experimental failure. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals (15 wild types + 20 transgenic).

By using combinations state-of-the-art high-yield recording techniques, we constantly increase the number of neurons recorded per animal, and hence reduce the total amount of animals needed per group. In all cases, we expect a dropout rate for these complications of about 30% for both transgenic and wild types. In addition, we expect additional maximum 20 % dropout rate for only to transgenic animals because of the plausible epileptic activity (see the Coherence section).

B. The animals

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

The hypotheses will be tested with male mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (AP^{dE9}) mutations which develop amyloid plaques beginning at 3-4 months of age without memory dysfunction. These animals show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age when these animals also suffer from severe amyloid plaque burden (9-11). These mice show increase in epileptic seizures between 3 and 4.5 months of age reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity (4). Therefore, studying the young animals may lead to the detection of early EEG biomarkers for early stages of AD, and studies with older animals to the characterization of the pathology of the cognitive loss.

For breeding 100 transgenic male are used.

Group size will be determined by power analysis as explained above. Each group will include transgenic animals and wild type litter mates as control animals as needed for the specific question. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals per group (20 transgenic and 15 wild type littermates as determined by power analysis). There will be 3 groups with both early and late stage mice, so the total amount of animals will be 210 animals. The detailed description of groups is provided in the figure 1 and in the table 2 (groups 9-11).

Life stages

The experiments will be performed in mice starting from 4-6 weeks until up to 18 months.

Table 2. Description of manipulations and procedures, and the discomfort level in different experimental groups. The head fixed animals are marked as the groups 9-11.

Groups #	Experiment	Manipulations and procedures				Discomfort	Number of animals	
Number of animals total 210 Out of which <ul style="list-style-type: none"> • Moderate discomfort: 140 • Severe discomfort: 70 		Surgical procedures If 2 -> SEVERE If 1 -> MODERATE		Manipulation of neural activity	Behavioral test		Young	Old
		Virus injection	Elect. implantation					
9	Electrophysiological characterization of neuronal activity and pharmacological manipulation	NO	YES	YES	YES	Cumulative: MODERATE	35	35
10	Electrophysiological characterization of neuronal activity and optogenetical/pharmacogenetical manipulation	YES	YES	YES	YES	Cumulative: SEVERE	35	35
11	Electrophysiological characterization of neuronal activity and electrical / ultrasound manipulation	NO	YES	YES	YES	Cumulative: MODERATE	35	35

Species

Origin

Maximum number of animals

Life stage

Mouse wt	own breeding	45	early stage 2-10 m
mouse tg	own breeding	60	early state 2-10 m
mouse tg	own breeding	60	late stage 11-18 m
mouse wt	own breeding	45	late stage 11-18 m
mouse tg	own breeding	100	for breeding until 14 months

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.

Animals that were used in one memory task may, when in good health conditions and when experimentally appropriate, be re-tested in a another memory task, helping reducing the number of animals used in total

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 At the moment, there are no alternative techniques capable of providing data about the relationship between behavior, learning, genetic modifications, and neural code. While our group has also expertise in computational modeling of neural systems, which are part of our research approach, for the questions that we target here there are too many missing data about biological neural network behavior for a purely theoretical approach.

We use rodents because the procedures for electrophysiological recordings, optogenetic stimulation and calcium/voltage sensitive dye imaging have been best fine-tuned in this species and to avoid use primates. Mice can perform complex memory tasks that cannot be performed by lower species while most of the brain areas know to be involved in these tasks have homologous counterparts in humans.

Reduction. It is to be noted that the high data-yield of our techniques permits a significant reduction in the number of animals needed to attain statistical significance in neurophysiological measures. Collecting the same amount of data with more traditional methodologies may require many times more animals.

The number of animals will be determined by power analyses which will take the expected experimental yield of our techniques in terms of recorded neurons into account.

Refinement The electrophysiological and behavioral techniques employed are established in the lab. Surgeries will employ advanced pain control (see below) and sterility techniques. Implantable devices are engineered (in many cases in-house) to obtain the lowest weight, smallest bulk, and maximum comfort for the animals, and are comparable with the state-of-the-art in the field in this respect. We will continue to refine our surgical techniques and devices, in order to minimize animal discomfort and adverse health consequences, as we have done in the past.

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

All animals will receive intensive pre and postsurgical care including anti-analgesic treatment, daily check of their health status and environmental enrichment. Anesthesia will be administered under monitoring of vital parameters (spO₂, heart rate).

Animals will gradually be habituated to the head fixed setup e.g. according to protocols developed by our collaborator.

During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Habituation to head-fixation will be done gradually and with positive reinforcement in a low-light environment. In our experience mice usually adapt quickly to this treatment and have been shown exhibit normal foraging, food consumption, grooming and sleeping behavior.

We use transgenic animals and genetically engineered viral vectors (of low-risk class) according to GGO national regulations, for prevention of human and environmental contamination.

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.

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

Surgeries will require anesthesia and pain relief

Rodents will be anesthetized with injection drugs, e.g. ketamine/ medetomidine or urethane (for non-recovery procedures) or gas (e.g. isoflurane) during surgeries, according to state-of-the-art accepted protocols, developed in collaboration with the IvD and animal facility personnel. Atropine will be administered to support respiratory function during surgeries. Analgesia will be guaranteed with carprofen, meloxicam or other approved agents during and after surgeries.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment).

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds. Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

Explain why these effects may emerge.

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment). All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds. Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment). All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds. Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases

the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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.

The following general humane endpoints will be applied:

- 1) When recovery after surgery is insufficient. In our experience, animals may lose some weight in the days immediately following the surgery. However, it will be considered if the animal shows permanent weight loss (more than 20% of the weight after the surgery for more than 7 days). In the case of juvenile animals, a lack of weight gain compatible with the animal life stage will be also considering a sign of impaired well-being.
- 2) When there are post-surgical complications, e.g. infection in the incision.
- 3) If pathogenesis without hope of recovery is determined. Visible signs of pathogenesis will be monitored such as infection, and condition of the fur. The following will be considered as signs of unhealthy state of the animal:
 - a. Aberrant behavior (e.g. freezing)
 - b. Shock
 - c. Dehydration
 - d. Weight loss
 - e. Nose and Mouth discharge
 - f. Bleeding
 - g. Fits/Seizures as described previously
 - h. Diarrhea

Should these unhealthy symptoms appear we will contact the vet to examine possible causes and monitor the animal closely to observe any improvement or decline in the condition of the animal. The vet will be consulted to judge the likelihood of recovery given the nature of the symptoms and their development. If recovery is judged unlikely or to involve prolonged suffering, then the humane endpoint will be reached.

4) When electrophysiological readings show that the head-plate is no longer firmly in place. This will be shown by a disruption of the normally stable background noise and an inability to stably record cells for a number of consecutive sessions. A recovery operation is then no longer possible.

5) When the animal is not learning the behavioral task after repeated attempts. Even if there is no worse discomfort conditions than foreseen, the experiment will be terminated, to prevent pointless manipulation

Indicate the likely incidence.

- 1: <10%
- 2: <5%
- 3: <5%
- 4: <5%
- 5: <5%

total < 30%

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).

Breeding: Mild, breeding animals

Handling stress: mild groups 9-11

Injection: mild, groups 10-11

Surgery and recovery: moderate groups 9 and 11, severe 10

Cumulative discomfort: moderate groups 9 and 11, severe 10

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.

The animal will be killed as part of the procedure to allow us to perform perfusion and histological analysis.

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>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Circuit manipulation in freely moving mice</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Circuit manipulation in freely moving mice
Serial number	Type of animal procedure					
2	Circuit manipulation in freely moving mice					

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.

The aim of these experiments is to investigate dynamics of memory within and between (interacting) relevant brain areas such as the hippocampus and neocortex in freely moving mice during (memory-) behavioral tasks. Although the use of head-fixed animals is motivated by several benefits as explained in [appendix 1], in terms of the relative ease by which complex experimental configuration may be achieved, the use of freely moving animals has the significant advantage of testing animals in a realistic or natural environment that cannot be achieved in a head-fixed setting, such as testing memory that involves direct exploration of an object or certain tasks involving spatial navigation, which heavily depends on vestibular inputs. For example it is known that neural correlates of spatial location in the hippocampus are quite different in a head-restrained, virtual reality condition compared to the freely moving situation.

In these series of experiments, we will combine state-of-the-art techniques to measure neural correlates of memory-dependent behavior to provide novel insight that will further our understanding in basic memory processes but also significantly contribute to our understanding of complex diseases and neuropsychiatric disorders where a memory deficit is a key feature.

The primary outcome measurements of these experiments are:

1. Behavioral readouts of freely moving animals in memory-related tasks for instance delayed T-test or object recognition task in which we will study various stages of memory, namely encoding, retention, consolidation and retrieval and how they are affected by progressive amyloid pathology. These tasks will involve spatial memory, recognition memory and working memory. The readout will involve e.g. percentage of trials correct, latency to response and time spent exploring.
2. Electrophysiological recordings of local and global level neural activity in memory-relevant brain for instance the hippocampus, entorhinal cortex, barrel cortex and thalamus areas to study neural correlates on a microcircuit level and the network level.
3. In vivo calcium activity measurements of memory-related areas to study individual cell activity during memory tasks with high spatial and temporal resolution
4. Optogenetic, pharmacogenetic or electrical stimulation manipulation of brain activity to study how increasing or suppressing activity in one brain area affects the behavior of the animal and how this affects activity in interacting brain areas. Stimulation may be delivered at arbitrary times, or triggered by the detection of specific patterns in neural activity
5. Measurement of the behavioral and neurophysiological effects of pharmacological manipulations, local or systemic
6. Ex-vivo Histological measures of gene expression, concentrations of relevant chemicals (e.g. neuromodulators, neurotransmitters), neuroanatomy, validation of implant placement.

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

The aim of the experiments is to investigate memory dynamics in vivo by using freely moving mice to manipulate and record or image brain activity in relevant brain areas during memory-relevant tasks. Behavioral procedures will depend on the state of the literature in this rapidly evolving field at the moment of the beginning of each experiment, and on the data we collect in previous experiment, but examples of envisaged experiments are:

- the characterization of spatial responses in the hippocampal formation and how they respond to behavioral as well as pharmacological, pharmacogenetical and optogenetic manipulations
- Recognition (e.g. of objects) memory tasks

In all cases, we will measure spontaneous ongoing behavior, or will reward the desired responses with an appetitive reward. In this procedure, no aversive conditioning (e.g. foot shocks) are foreseen.

Preparation and surgery

Surgeries: stereotaxic surgery will be required for brain implants, used to record and manipulate brain activity.

We will implant the following types of devices

- 1) electrode arrays/electrode probes
- 2) optic fibers for optogenetic stimulation
- 3) miniature lenses for microendoscope imaging

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3) separate stereotaxic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors (used in all groups), for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This cannot be combined with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies, if too long a time elapses between the implantation and the

In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope. These groups will underlie three surgeries

Under certain circumstances it will be necessary to put the animal under anesthesia to repair or improve the efficiency of the implant.

To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly.

Manipulations

Animals are subjected to pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical or electrical manipulation to restore and/or prevent abnormal neuronal activity. In the goal two the aim is to characterize the mechanism of action of different treatments for AD related hyperactivity. The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg), or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (7,8,19). Alternatively, intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (20). Optogenetical manipulation is achieved by injecting viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel. Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (21). Ultrasound stimulation of brain areas will be achieved by an integrated focused ultrasound system was used (22). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (23).

Behavioral training

Animals will be trained in several memory- or sensory-related tasks. Some of these tasks will require food or water restriction for optimal performance of the animal. Training of the animals will be conducted 5-6 days per week and depending on the task will require to be trained until the animal has reached criterion (>80% trials correct).

Optical or electrical manipulations will be performed during various phases of the memory task, such as encoding, retention, consolidation and retrieval. The readout will consist of the behavioral performance, electrophysiological recordings and/or imaging of cell activity.

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

For each experimental group, the number of animals will be assessed by power analysis. Power analysis will take into account the high yield in terms of recorded cells of our methodologies. For each measure, the appropriate N number will be selected, which may be number of animals, or number of recorded neurons, or number of electrodes, etc. Because these are novel procedures, some pilot experiments will be needed to assess the effect sizes before a proper analysis can be performed. When possible we will use data from similar experiments in the literature for an initial guess of the effect sizes. Number of animals will be increased to allow for dropout due to non-functioning implants, problems at surgery, or other causes of experimental failure. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals (15 wild types + 20 transgenic).

By using combinations state-of-the-art high-yield recording techniques, we constantly increase the number of neurons recorded per animal, and hence reduce the total amount of animals needed per group. In all cases, we expect a dropout rate for these complications of about 30% for both transgenic and wild types. In addition, we expect additional maximum 20 % dropout rate for transgenic animals because of the plausible epileptic activity (see the Coherence section).

B. The animals

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

The hypotheses will be tested with male mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (APdE9) mutations which develop amyloid plaques beginning at 3-4 months of age without memory dysfunction. These animals show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age when these animals also suffer from severe amyloid plaque burden (9-11). These mice show increase in epileptic seizures between 3 and 4.5 months of age reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity (4). Therefore, studying the young animals may lead to the detection of early EEG biomarkers for early stages of AD, and studies with older animals to the characterization of the pathology of the cognitive loss.

Group size will be determined by power analysis as explained above. Each group will include transgenic animals and wild type litter mates as control animals as needed for the specific question. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals per group (20 transgenic and 15 wild type littermates as determined by power analysis). There will be 8 groups with both early and late stage mice, so the total amount of animals will be 560 animals.

For breeding 300 transgenic males are used.

The detailed description of groups is provided in the figure 1 and in the table 3 (groups 1-8).

Groups #	Experiment	Manipulations and procedures					Discomfort	Number of animals		
	Number of animals total 560 Out of which <ul style="list-style-type: none"> Moderate discomfort: 280 Severe discomfort: 280 	Surgical procedures If more than 1 -> SEVERE If 1 -> MODERATE				Manipulation of neural activity	Behavioral test		Young	Old
		Virus injection	Electrode implantation	Lens surgery	Lens base surgery					
1-4	Electrophysiological characterization of neuronal activity and pharmacological / electrical manipulation	NO	YES	NO	NO	YES	YES	Cumulative: MODERATE	4x35 =140	4x35 =140
5	Electrophysiological characterization of neuronal activity and optogenetical or pharmacogenetical manipulation	YES	YES	NO	NO	YES	YES	Cumulative: SEVERE	35	35
6-8	Calcium imaging of neuronal activity and pahramacological or optogenetical or pharmacogenetical manipulation (Implantation of calcium imaging lens needs 2 operations!, 3 surgical procedures in these groups)	YES	NO	YES	YES	YES	YES	Cumulative: SEVERE	3x35 =105	3x35 =105

Life stages

The experiments will be performed in mice starting from 4-6 weeks until up to 18 months.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse wt	own breeding	120	early stage 2-10 months
mouse tg	own breeding	160	late stage 11-18
mouse tg	own breeding	160	early stage 2-10 months
mouse wt	own breeding	120	late stage 11-18
mouse tg	own breeding	300	for breeding till 14 months

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.

Animals that were used in one memory task may, when in good health conditions and when experimentally appropriate, be re-used for a different memory task, helping reducing the number of animals used in total. In no case will an animal be measured for more than 2 months, or be in an experiment after 1 year of age. Animals experiencing discomfort beyond moderate will not be re-used.

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 At the moment, there are no alternative techniques capable of providing data about the relationship between behavior, learning, genetic modifications, and neural code. While our group has also expertise in computational modeling of neural systems, which are part of our research approach, for the questions that we target here there are too many missing data about biological neural network behavior for a purely theoretical approach.

We use rodents because the procedures for electrophysiological recordings, optogenetic stimulation and calcium/voltage sensitive dye imaging have

been best fine-tuned in this species and to avoid use primates. Mice can perform complex memory tasks that cannot be performed by lower species while most of the brain areas known to be involved in these tasks have homologous counterparts in humans.

Reduction. It is to be noted that the high data-yield of our techniques permits a significant reduction in the number of animals needed to attain statistical significance in neurophysiological measures. Collecting the same amount of data with more traditional methodologies may require many times more animals.

The number of animals will be determined by power analyses which will take the expected experimental yield of our techniques in terms of recorded neurons into account.

Refinement The electrophysiological and behavioral techniques employed are established in the lab. Surgeries will employ advanced pain control (see below) and sterility techniques. Implantable devices are engineered (in many cases in-house) to obtain the lowest weight, smallest bulk, and maximum comfort for the animals, and are comparable with the state-of-the-art in the field in this respect. We will continue to refine our surgical techniques and devices, in order to minimize animal discomfort and adverse health consequences, as we have done in the past.

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

All animals will receive intensive pre and postsurgical care including anti-analgesic treatment, daily check of their health status and environmental enrichment.

Anesthesia will be administered under monitoring of vital parameters (spO₂, heart rate).

During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. However, daily periods of social interactions with former littermates can usually be arranged after training.

During this period, animals will be checked daily for their health status and will receive additional food if required.

Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

We use transgenic animals and genetically engineered viral vectors (of low-risk class) according to GGO national regulations, for prevention of human and environmental contamination.

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.

After the surgery the animals are housed in individual cages because of veterinary concerns regarding animal well-being related to allow a short term recovery post-operatively and restrict a long term aggressive behaviour of cage mates towards animal with chronical implant.

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.

Surgeries will require anesthesia and pain relief.

Mice will be anesthetized with injection drugs, e.g. ketamine/ medetomidine or urethane (for non-recovery procedures) or gas (e.g. isoflurane) during surgeries, according to state-of-the-art accepted protocols, developed in collaboration with the IvD and animal facility personnel. Atropine will be administered to support respiratory function during surgeries. Analgesia will be guaranteed with carprofen, meloxicam or other approved agents during and after surgeries.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

Explain why these effects may emerge.

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment.

Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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.

1) When recovery after surgery is insufficient. In our experience, animals may lose some weight in the days immediately following the surgery. However, it will be considered if the animal shows permanent weight loss (more than 20% of the weight after the surgery for more than 7 days).

2) When there are post-surgical complications, e.g. infection in the incision.

3) If pathogenesis without hope of recovery is determined. Visible signs of pathogenesis will be monitored such as infection, and condition of the fur. The following will be considered as signs of unhealthy state of the animal:

Aberrant behavior (e.g. freezing)

Shock

Dehydration

Weight loss

Nose and Mouth discharge

Bleeding

Fits/ Seizures as described previously

Diarrhea

Should these unhealthy symptoms appear we will contact the vet to examine possible causes and monitor the animal closely to observe any improvement or decline in the condition of the animal. The vet will be consulted to judge the likelihood of recovery given the nature of the symptoms and their development. If recovery is judged unlikely or to involve prolonged suffering, then the humane endpoint will be reached.

4) When electrophysiological readings show that the head-plate is no longer firmly in place. This will be shown by a disruption of the normally stable background noise and an inability to stably record cells for a number of consecutive sessions. A recovery operation is then no longer possible.

5) when the animal is not learning the behavioral task after repeated attempts. Even if there is no worse discomfort conditions than foreseen, the experiment will be terminated, to prevent pointless manipulation

Indicate the likely incidence.

1: <10%

2: <5%

3: <5%

4: <5%
5: <5%

total < 30%

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).

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

Breeding: Mild, breeding animals

Handling stress: mild, groups 1-8

Injection: mild, groups 1-8

Surgery and recovery: moderate groups 1-4, severe groups 5-8

Cumulative discomfort: moderate groups 1-4, severe groups 5-8

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.

The animal will be killed as part of the procedure to allow us to perform perfusion and histological analysis.

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 1	Type of animal procedure Circuit manipulations in behaving, head-fixed mice

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.

The aim of this experiment will be to investigate brain dynamics in the brain areas linked to amyloid related hyperactivity and interacting areas, during memory and sensory dependent behaviors.

Experiments with awake, head-fixed mice are an important complementary method to freely moving and anesthetized preparations. Whereas freely moving animals allow for more complex naturalistic behaviors, head-fixed experiments have several important advantages:

By fixing the animal's position within an experimental setup and restricting it in its behavioral repertoire (while still allowing to perform the behaviors of interest), precise description of the animal's behavior and location is facilitated enormously. In addition, exact sensory stimulation is made possible. This stimulation could for example be real objects that are presented to the animal, or virtual stimuli such as images and scenes on a screen, or controlled stimulation of the rodent's whiskers. To leverage the natural behavior of rodents to run around while interacting with their environment, we will usually combine head-fixation with a mechanism that allows the rodent to perform walking and running movements while being fixated. These mechanisms can, for example, be (spherical) treadmills, wheels, or air suspended platforms that the rodent can move to create the illusion of running. In combination with a virtual reality setup, this additionally allows to create experiments in which the rodents can interact with huge, practically infinitely large environments, making it possible to assess complex forms of memory guided behavior.

A second advantage of head-fixed animals is the possibility to use more complex neural recording techniques – most imaging techniques, for example, require the animal to be still while an image is acquired. Semi-acute electrophysiological recordings, in which the recording electrodes are inserted into the brain in each session significantly decrease the time and complexity of preparatory surgeries (thus reducing the animal's discomfort and increasing success rate) while giving the freedom to easily adjust electrode position between experimental sessions and thereby increasing the yield of neural measurements.

Ultimately the goal of using these state of the art recording techniques in combination with methods to manipulate neural activity during memory dependent tasks is to infer causal relationships between neural activity and memory performance.

The primary outcome measurements of these experiments are:

1. Measurements of behavioral performance of head-fixed mice during various memory and sensory related tasks including test of sensory memories, spatial memories and object memories (in a virtual reality environment). For instance, memory testing will be performed in a head-fixed,

virtual reality version of the Morris Water Maze, where APP-PS1 are known to be impaired and, pharmacological treatments are known to have a partial rescue effect. Our pilot studies show that mice can learn maze tasks quite effectively in this kind of setup. Parameters such as percent correct, latency to response, confusion matrix (which responses are measured with which stimuli) will be measured. Animal motion will be measured by sensing the movement of the track ball, treadmill or wheel that supports the animal. Additional bodily parameters such as ECG, or pupil diameter, gaze direction (by infrared camera) may be measured in non-invasive fashions.

2. Electrophysiological recordings of local network (single cell & neural ensemble) and global network level (local field potentials, EEG) activity in a network of memory related brain structures such as the hippocampus, entorhinal cortex or sensory areas such as barrel cortex and connected thalamic areas in awake head-fixed rodents that perform memory related tasks, to obtain fine time resolution measures of memory-related brain activity

3. Calcium and voltage-sensitive dye imaging measurements with two-photon microscopes and mini-cameras to obtain high throughput (hundreds of neurons simultaneously monitored), medium-time (10-100 ms) resolution monitoring of neural activity in a network of memory related structures in awake head-fixed mice that perform memory related tasks.

4. Optogenetic, pharmacogenetic and pharmacological perturbation of neural functioning, in combination with imaging or recording of neural activity in the same or related brain structures and/or analysis of behavioral changes during the perturbation. This could for example be optogenetic stimulation of neurons, or pharmacological blockade of a specific neurotransmitter in mice that perform a memory guided sensory discrimination task.

5. Use of electrophysiological and optical imaging techniques as well as optogenetic/ electrical /ultrasound manipulations in a network of memory related structures in anesthetized animals, for characterization of basic network properties, independent of behavior

6. *Ex-vivo* Histological measures of gene expression, concentrations of relevant chemicals (e.g. neuromodulators, neurotransmitters), neuroanatomy, validation of implant placement.

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

Animals will be accommodated to the housing facilities following the usual procedures in our facility. To motivate the natural running behavior of rodents, which is essential for experiments in which running is required, the animals will be provided with additional cage enrichment, for example in the form of running wheels, toys, or objects to explore, unless this is deemed unnecessary or detrimental to animal welfare, based on observation of subject behavior.

Preparation and Surgery:

For behavioral experiments, at the beginning of each experiment the animals have to undergo a surgery including different steps depending on the group

- head-post (for head restraint) implant
- Implantation of optic fibers
- the preparation of craniotomies or the implantation of electrodes to ensure target brain areas are accessible for later recording sessions
- implantations of cranial windows
- Implantation of microendoscopic lenses
- the injection of viral vectors for calcium/voltage sensitive dye and optogenetic / pharmacogenetical studies

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3) separate stereotactic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors, for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This can be combined with the head-post implantation but not with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies. In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope

In general, we will strive to minimize the number of surgeries necessary.

Animals that undergo viral injections need to remain in quarantine in independently ventilated cages for a 1-3 week periods, according to GGO regulations.

Manipulations

Animals are subjected to pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical or electrical manipulation to restore and/or prevent abnormal neuronal activity. In the goal two the aim is to characterize the mechanism of action of different treatments for AD related hyperactivity. The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg), or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (7,8,19). Alternatively, intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (20). Optogenetical manipulation is achieved by injecting viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel. Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (21). Ultrasound stimulation of brain areas will be achieved by an integrated focused ultrasound system was used (22). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (23).

Training/ Recordings

Behavioral experiments: All tasks used are of an appetitive nature. Training is done gradually and with positive reinforcement to support the animals' habituation to the training/recording setup and task.

Initially, animals are habituated to restraint and to head fixation, and then trained in the specific task of interest. Animals might be mildly food or water restricted to motivate behavioral performance of the animal with food or fluid. All food restricted animals will be monitored closely to ensure sufficient food intake. To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly.

Training continues between 1 day and several weeks (max. 12 weeks with an animal) for more complex tasks but generally until a certain behavioral criterion is reached (e.g. 70% trials correct in 1 session). Sessions usually last between 30 minutes and 2-3 hours per day, where care is taken to only continue the session while the animal is accepting the head fixation.

During semi-acute and acute electrophysiological recording sessions, electrodes are inserted into the brain structures of interest and recordings are performed. Due to the lack of sub-dural pain receptors, mice usually take very little notice of this procedure even without anesthesia and analgesia. Optical imaging can usually be done by placing the imaging microscope or mini camera over the previously prepared imaging area and don't require additional invasive procedures.

Recording session, electrical and optical, will take place daily, either after behavioral criterion is reached, or during training, depending on the task.

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

Animals will be accommodated to the housing facilities following the usual procedures in our facility. To motivate the natural running behavior of rodents, which is essential for experiments in which running is required, the animals will be provided with additional cage enrichment, for example in the form of running wheels, toys, or objects to explore, unless this is deemed unnecessary or detrimental to animal welfare, based on observation of subject behavior.

Preparation and Surgery:

For behavioral experiments, at the beginning of each experiment the animals have to undergo a surgery including different steps depending on the group

- head-post (for head restraint) implant
- Implantation of optic fibers
- the preparation of craniotomies or the implantation of electrodes to ensure target brain areas are accessible for later recording sessions
- implantations of cranial windows
- Implantation of microendoscopic lenses
- the injection of viral vectors for calcium/voltage sensitive dye and optogenetic / pharmacogenetical studies

Under certain circumstances it will be necessary to put the animal under anesthesia to repair or improve the efficiency of the implant.

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3 e.g. head post implantation + injection of viral vectors + implantation of optic fibers) separate stereotactic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors, for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This can be combined with the head-

post implantation but not with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies. In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope

In general, we will strive to minimize the number of surgeries necessary.

Animals that undergo viral injections need to remain in quarantine in independently ventilated cages for a 1-3 week periods, according to GGO regulations.

Manipulations

The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg) or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (29,30,42). Intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (11). Optogenetical manipulation is achieved by injecting once viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel (12). Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (13). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration once or several times of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (13).

Training/ Recordings

Behavioral experiments: All tasks used are of an appetitive nature. Training is done gradually and with positive reinforcement to support the animals' habituation to the training/recording setup and task.

Initially, animals are habituated to restraint and to head fixation, and then trained in the specific task of interest. Animals might be mildly food or water restricted to motivate behavioral performance by rewarding the animal with food or fluid reward. All food restricted animals will be monitored closely to ensure sufficient food intake. To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly. We have tried it before with rats and mice. If rats start to argue the implant is among the first thing they bite. We saw it and there was pieces bit off from the head implant. Also with mice we have had the same issues. Since it is impossible to prevent the fighting and nibbling it is too risky to keep 2 animals in the same cage. Even one bite can destroy (reference or ground) the whole recording system and consequently I need to sacrifice the animal.

Training continues between 1 day and several weeks (max. 12 weeks with an animal) for more complex tasks but generally until a certain behavioral criterion is reached (e.g. 70% trials correct in 1 session). Sessions usually last between 30 minutes and 2-3 hours per day, where care is taken to only continue the session while the animal is accepting the head fixation.

During semi-acute and acute electrophysiological recording sessions, electrodes are inserted into the brain structures of interest and recordings are performed. Due to the lack of sub-dural pain receptors, mice usually take very little notice of this procedure even without anesthesia and analgesia. Optical imaging can usually be done by placing the imaging microscope or mini camera over the previously prepared imaging area and don't require additional invasive procedures.

Recording session, electrical and optical, will take place daily, either after behavioral criterion is reached, or during training, depending on the task.

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

For each experimental group, the number of animals will be assessed by power analysis. Power analysis will take into account the high yield in terms of recorded cells of our methodologies. For each measure, the appropriate N number will be selected, which may be number of animals, or number of recorded neurons, or number of electrodes, etc. Because these are novel procedures, some pilot experiments will be needed to assess the effect sizes before a proper analysis can be performed. When possible we will use data from similar experiments in the literature for an initial guess of the effect sizes. Number of animals will be increased to allow for dropout due to non-functioning implants, problems at surgery, or other causes of experimental failure. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals (15 wild types + 20 transgenic).

By using combinations state-of-the-art high-yield recording techniques, we constantly increase the number of neurons recorded per animal, and hence reduce the total amount of animals needed per group. In all cases, we expect a dropout rate for these complications of about 30% for both transgenic and wild types. In addition, we expect additional maximum 20 % dropout rate for only to transgenic animals because of the plausible epileptic activity (see the Coherence section).

B. The animals

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

The hypotheses will be tested with male mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (AP^{dE9}) mutations which develop amyloid plaques beginning at 3-4 months of age without memory dysfunction. These animals show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age when these animals also suffer from severe amyloid plaque burden (9-11). These mice show increase in epileptic seizures between 3 and 4.5 months of age reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity (4). Therefore, studying the young animals may lead to the detection of early EEG biomarkers for early stages of AD, and studies with older animals to the characterization of the pathology of the cognitive loss.

For breeding 100 transgenic male are used.

Group size will be determined by power analysis as explained above. Each group will include transgenic animals and wild type litter mates as control animals as needed for the specific question. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals per group (20 transgenic and 15 wild type littermates as determined by power analysis). There will be 3 groups with both early and late stage mice, so the total amount of animals will be 210 animals. The detailed description of groups is provided in the figure 1 and in the table 2 (groups 9-11).

Life stages

The experiments will be performed in mice starting from 4-6 weeks until up to 18 months.

Table 2. Description of manipulations and procedures, and the discomfort level in different experimental groups. The head fixed animals are marked as the groups 9-11.

Groups #	Experiment	Manipulations and procedures				Discomfort	Number of animals	
Number of animals total 210 Out of which <ul style="list-style-type: none"> • Moderate discomfort: 140 • Severe discomfort: 70 		Surgical procedures If 2 -> SEVERE If 1 -> MODERATE		Manipulation of neural activity	Behavioral test		Young	Old
		Virus injection	Elect. implantation					
9	Electrophysiological characterization of neuronal activity and pharmacological manipulation	NO	YES	YES	YES	Cumulative: MODERATE	35	35
10	Electrophysiological characterization of neuronal activity and optogenetical/pharmacogenetical manipulation	YES	YES	YES	YES	Cumulative: SEVERE	35	35
11	Electrophysiological characterization of neuronal activity and electrical / ultrasound manipulation	NO	YES	YES	YES	Cumulative: MODERATE	35	35

Species

Origin

Maximum number of animals

Life stage

Mouse wt	own breeding	45	early stage 2-10 m
mouse tg	own breeding	60	early state 2-10 m
mouse tg	own breeding	60	late stage 11-18 m
mouse wt	own breeding	45	late stage 11-18 m
mouse tg	own breeding	100	for breeding until 14 months

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.

Animals that were used in one memory task may, when in good health conditions and when experimentally appropriate, be re-tested in a another memory task, helping reducing the number of animals used in total

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 At the moment, there are no alternative techniques capable of providing data about the relationship between behavior, learning, genetic modifications, and neural code. While our group has also expertise in computational modeling of neural systems, which are part of our research approach, for the questions that we target here there are too many missing data about biological neural network behavior for a purely theoretical approach.

We use rodents because the procedures for electrophysiological recordings, optogenetic stimulation and calcium/voltage sensitive dye imaging have been best fine-tuned in this species and to avoid use primates. Mice can perform complex memory tasks that cannot be performed by lower species while most of the brain areas know to be involved in these tasks have homologous counterparts in humans.

Reduction. It is to be noted that the high data-yield of our techniques permits a significant reduction in the number of animals needed to attain statistical significance in neurophysiological measures. Collecting the same amount of data with more traditional methodologies may require many times more animals.

The number of animals will be determined by power analyses which will take the expected experimental yield of our techniques in terms of recorded neurons into account.

Refinement The electrophysiological and behavioral techniques employed are established in the lab. Surgeries will employ advanced pain control (see below) and sterility techniques. Implantable devices are engineered (in many cases in-house) to obtain the lowest weight, smallest bulk, and maximum comfort for the animals, and are comparable with the state-of-the-art in the field in this respect. We will continue to refine our surgical techniques and devices, in order to minimize animal discomfort and adverse health consequences, as we have done in the past.

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

All animals will receive intensive pre and postsurgical care including anti-analgesic treatment, daily check of their health status and environmental enrichment. Anesthesia will be administered under monitoring of vital parameters (spO₂, heart rate).

Animals will gradually be habituated to the head fixed setup e.g. according to protocols developed by our collaborator.

During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Habituation to head-fixation will be done gradually and with positive reinforcement in a low-light environment. In our experience mice usually adapt quickly to this treatment and have been shown exhibit normal foraging, food consumption, grooming and sleeping behavior.

We use transgenic animals and genetically engineered viral vectors (of low-risk class) according to GGO national regulations, for prevention of human and environmental contamination.

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.

After the surgery the animals are housed in individual cages because of veterinary concerns regarding animal well-being related to allow a short term recovery post-operatively and restrict a long term aggressive behaviour of cage mates towards animal with chronical implant. [Related the behavioral task mild water or food restriction will be applied in individual housing.](#)

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?

H. Pain and pain relief

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.

Surgeries will require anesthesia and pain relief

Rodents will be anesthetized with injection drugs, e.g. ketamine/ medetomidine or urethane (for non-recovery procedures) or gas (e.g. isoflurane) during surgeries, according to state-of-the-art accepted protocols, developed in collaboration with the IvD and animal facility personnel. Atropine will be administered to support respiratory function during surgeries. Analgesia will be guaranteed with carprofen, meloxicam or other approved agents during and after surgeries.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment). All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds. Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

Explain why these effects may emerge.

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment).

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (for mice: never below 90% body weight, restriction only in the hours right before the experiment).

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APdE9 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint. In most cases the risk for discomfort is moderate at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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.

The following general humane endpoints will be applied:

- 1) When recovery after surgery is insufficient. In our experience, animals may lose some weight in the days immediately following the surgery. However, it will be considered if the animal shows permanent weight loss (more than 20% of the weight after the surgery for more than 7 days). In the case of juvenile animals, a lack of weight gain compatible with the animal life stage will be also considering a sign of impaired well-being.
- 2) When there are post-surgical complications, e.g. infection in the incision.
- 3) If pathogenesis without hope of recovery is determined. Visible signs of pathogenesis will be monitored such as infection, and condition of the fur. The following will be considered as signs of unhealthy state of the animal:
 - a. Aberrant behavior (e.g. freezing)
 - b. Shock
 - c. Dehydration
 - d. Weight loss
 - e. Nose and Mouth discharge
 - f. Bleeding
 - g. Fits/Seizures as described previously
 - h. Diarrhea

Should these unhealthy symptoms appear we will contact the vet to examine possible causes and monitor the animal closely to observe any improvement or decline in the condition of the animal. The vet will be consulted to judge the likelihood of recovery given the nature of the symptoms and their development. If recovery is judged unlikely or to involve prolonged suffering, then the humane endpoint will be reached.

4) When electrophysiological readings show that the head-plate is no longer firmly in place. This will be shown by a disruption of the normally stable background noise and an inability to stably record cells for a number of consecutive sessions. A recovery operation is then no longer possible.

5) When the animal is not learning the behavioral task after repeated attempts. Even if there is no worse discomfort conditions than foreseen, the experiment will be terminated, to prevent pointless manipulation

Indicate the likely incidence.

- 1: <10%
- 2: <5%
- 3: <5%
- 4: <5%
- 5: <5%

total < 30%

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).

Breeding: Mild, breeding animals

Handling stress: mild groups 9-11

Injection: mild, groups 10-11

Surgery and recovery: moderate groups 9 and 11, severe 10

Cumulative discomfort: moderate groups 9 and 11, severe 10

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.

The animal will be killed as part of the procedure to allow us to perform perfusion and histological analysis.

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>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Circuit manipulation in freely moving mice</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Circuit manipulation in freely moving mice
Serial number	Type of animal procedure					
2	Circuit manipulation in freely moving mice					

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.

The aim of these experiments is to investigate dynamics of memory within and between (interacting) relevant brain areas such as the hippocampus and neocortex in freely moving mice during (memory-) behavioral tasks. Although the use of head-fixed animals is motivated by several benefits as explained in [appendix 1], in terms of the relative ease by which complex experimental configuration may be achieved, the use of freely moving animals has the significant advantage of testing animals in a realistic or natural environment that cannot be achieved in a head-fixed setting, such as testing memory that involves direct exploration of an object or certain tasks involving spatial navigation, which heavily depends on vestibular inputs. For example it is known that neural correlates of spatial location in the hippocampus are quite different in a head-restrained, virtual reality condition compared to the freely moving situation.

In these series of experiments, we will combine state-of-the-art techniques to measure neural correlates of memory-dependent behavior to provide novel insight that will further our understanding in basic memory processes but also significantly contribute to our understanding of complex diseases and neuropsychiatric disorders where a memory deficit is a key feature.

The primary outcome measurements of these experiments are:

1. Behavioral readouts of freely moving animals in memory-related tasks for instance delayed T-test or object recognition task in which we will study various stages of memory, namely encoding, retention, consolidation and retrieval and how they are affected by progressive amyloid pathology. These tasks will involve spatial memory, recognition memory and working memory. The readout will involve e.g. percentage of trials correct, latency to response and time spent exploring.
2. Electrophysiological recordings of local and global level neural activity in memory-relevant brain for instance the hippocampus, entorhinal cortex, barrel cortex and thalamus areas to study neural correlates on a microcircuit level and the network level.
3. In vivo calcium activity measurements of memory-related areas to study individual cell activity during memory tasks with high spatial and temporal resolution
4. Optogenetic, pharmacogenetic or electrical stimulation manipulation of brain activity to study how increasing or suppressing activity in one brain area affects the behavior of the animal and how this affects activity in interacting brain areas. Stimulation may be delivered at arbitrary times, or triggered by the detection of specific patterns in neural activity
5. Measurement of the behavioral and neurophysiological effects of pharmacological manipulations, local or systemic
6. Ex-vivo Histological measures of gene expression, concentrations of relevant chemicals (e.g. neuromodulators, neurotransmitters), neuroanatomy, validation of implant placement.

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

The aim of the experiments is to investigate memory dynamics in vivo by using freely moving mice to manipulate and record or image brain activity in relevant brain areas during memory-relevant tasks. Behavioral procedures will depend on the state of the literature in this rapidly evolving field at the moment of the beginning of each experiment, and on the data we collect in previous experiment, but examples of envisaged experiments are:

- the characterization of spatial responses in the hippocampal formation and how they respond to behavioral as well as pharmacological, pharmacogenetical and optogenetic manipulations
- Recognition (e.g. of objects) memory tasks

In all cases, we will measure spontaneous ongoing behavior, or will reward the desired responses with an appetitive reward. In this procedure, no aversive conditioning (e.g. foot shocks) are foreseen.

Preparation and surgery

Surgeries: stereotaxic surgery will be required for brain implants, used to record and manipulate brain activity.

We will implant the following types of devices

- 1) electrode arrays/electrode probes
- 2) optic fibers for optogenetic stimulation
- 3) miniature lenses for microendoscope imaging

Depending on the specific projects and complexity of the procedures, these preparations can be either performed in one or more (max. 3) separate stereotaxic surgeries. A second surgery is required as some steps require an interval of weeks between them. Injections of viral vectors (used in all groups), for example, has to be performed in advance to allow sufficient time for viral expression. A 2-10 weeks incubation period, depending on the transfected gene and the target structure. This cannot be combined with other implantation procedures, to reduce the risk of infection in craniotomies, if too long a time elapses between the implantation and the

In the case of microscopy techniques such as mini-camera imaging, these require sufficient expression of the injected viral construct and the availability of fluorescent signals at surgery for implantable components (lenses, cranial windows) to be correctly positioned. This needs to be done in two successive steps, to ensure correct positioning of the lens and the microscope. These groups will underlie three surgeries

Under certain circumstances it will be necessary to put the animal under anesthesia to repair or improve the efficiency of the implant.

To protect neural implants or to ensure equal food availability and sufficient food intake, animals with implants will need to be housed singularly.

Manipulations

Animals are subjected to pharmacological, optogenetical, pharmacogenetical or electrical manipulation to restore and/or prevent abnormal neuronal activity. In the goal two the aim is to characterize the mechanism of action of different treatments for AD related hyperactivity. The animals will be treated with acute intraperitoneal injection of a low dose of clonazepam (0.05 mg/kg), or with antiepileptic drug, levetiracetam, acutely 200 mg/kg i.p., or chronically 75 mg/kg daily administered by miniosmotic pumps (e.g. Alzet miniosmotic pumps <http://www.alzet.com/>) for 28 days. The dosing is based on previous animal and human experiments for controlling hyperactivity in memory decline (7,8,19). Alternatively, intracortical bipolar stimulation is achieved by stimulating the deep part of the electrode in the cortex (20). Optogenetical manipulation is achieved by injecting viral vectors carrying a gene construct for light sensitive ion channel. Additionally, animals are equipped with small chronic optic cable during electrode implantation (21). Ultrasound stimulation of brain areas will be achieved by an integrated focused ultrasound system was used (22). Pharmacogenetical manipulation will be based on A DREADD, designer receptor, which will be expressed in neurons. Since the HM4Di has no natural ligands and respond exclusively to a synthetic small molecule, clozapine N-oxide (CNO), administration of CNO provides us a temporally and spatially specific method to control hyperactive (23).

Behavioral training

Animals will be trained in several memory- or sensory-related tasks. Some of these tasks will require food or water restriction for optimal performance of the animal. Training of the animals will be conducted 5-6 days per week and depending on the task will require to be trained until the animal has reached criterion (>80% trials correct).

Optical or electrical manipulations will be performed during various phases of the memory task, such as encoding, retention, consolidation and retrieval. The readout will consist of the behavioral performance, electrophysiological recordings and/or imaging of cell activity.

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

For each experimental group, the number of animals will be assessed by power analysis. Power analysis will take into account the high yield in terms of recorded cells of our methodologies. For each measure, the appropriate N number will be selected, which may be number of animals, or number of recorded neurons, or number of electrodes, etc. Because these are novel procedures, some pilot experiments will be needed to assess the effect sizes before a proper analysis can be performed. When possible we will use data from similar experiments in the literature for an initial guess of the effect sizes. Number of animals will be increased to allow for dropout due to non-functioning implants, problems at surgery, or other causes of experimental failure. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals (15 wild types + 20 transgenic).

By using combinations state-of-the-art high-yield recording techniques, we constantly increase the number of neurons recorded per animal, and hence reduce the total amount of animals needed per group. In all cases, we expect a dropout rate for these complications of about 30% for both transgenic and wild types. In addition, we expect additional maximum 20 % dropout rate for transgenic animals because of the plausible epileptic activity (see the Coherence section).

B. The animals

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

The hypotheses will be tested with male mice carrying human APP^{swe} and PS1^{dE9} (APdE9) mutations which develop amyloid plaques beginning at 3-4 months of age without memory dysfunction. These animals show memory impairment in memory tasks around 10-12 months of age when these animals also suffer from severe amyloid plaque burden (9-11). These mice show increase in epileptic seizures between 3 and 4.5 months of age reaching eventually a prevalence of 60% of the population (3). At this age, as we have shown, mice also display cortical and-thalamic hyperactivity (4). Therefore, studying the young animals may lead to the detection of early EEG biomarkers for early stages of AD, and studies with older animals to the characterization of the pathology of the cognitive loss.

Group size will be determined by power analysis as explained above. Each group will include transgenic animals and wild type litter mates as control animals as needed for the specific question. The maximum group size for each group, based on our experience, will be 35 animals per group (20 transgenic and 15 wild type littermates as determined by power analysis). There will be 8 groups with both early and late stage mice, so the total amount of animals will be 560 animals.

For breeding 300 transgenic males are used.

The detailed description of groups is provided in the figure 1 and in the table 3 (groups 1-8).

Groups #	Experiment	Manipulations and procedures				Discomfort	Number of animals			
	Number of animals total 560 Out of which <ul style="list-style-type: none"> Moderate discomfort: 280 Severe discomfort: 280 	Surgical procedures If more than 1 -> SEVERE If 1 -> MODERATE					Young	Old		
		Virus injection	Electrode implantation	Lens surgery	Lens base surgery	Manipulation of neural activity	Behavioral test			
1-4	Electrophysiological characterization of neuronal activity and pharmacological / electrical manipulation	NO	YES	NO	NO	YES	YES	Cumulative: MODERATE	4x35 =140	4x35 =140
5	Electrophysiological characterization of neuronal activity and optogenetical or pharmacogenetical manipulation	YES	YES	NO	NO	YES	YES	Cumulative: SEVERE	35	35
6-8	Calcium imaging of neuronal activity and pahramacological or optogenetical or pharmacogenetical manipulation (Implantation of calcium imaging lens needs 2 operations!, 3 surgical procedures in these groups)	YES	NO	YES	YES	YES	YES	Cumulative: SEVERE	3x35 =105	3x35 =105

Life stages

The experiments will be performed in mice starting from 4-6 weeks until up to 18 months.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse wt	own breeding	120	early stage 2-10 months
mouse tg	own breeding	160	late stage 11-18
mouse tg	own breeding	160	early stage 2-10 months
mouse wt	own breeding	120	late stage 11-18
mouse tg	own breeding	300	for breeding till 14 months

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.

Animals that were used in one memory task may, when in good health conditions and when experimentally appropriate, be re-used for a different memory task, helping reducing the number of animals used in total. In no case will an animal be measured for more than 2 months, or be in an experiment after 1 year of age. Animals experiencing discomfort beyond moderate will not be re-used.

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 At the moment, there are no alternative techniques capable of providing data about the relationship between behavior, learning, genetic modifications, and neural code. While our group has also expertise in computational modeling of neural systems, which are part of our research approach, for the questions that we target here there are too many missing data about biological neural network behavior for a purely theoretical approach.

We use rodents because the procedures for electrophysiological recordings, optogenetic stimulation and calcium/voltage sensitive dye imaging have

been best fine-tuned in this species and to avoid use primates. Mice can perform complex memory tasks that cannot be performed by lower species while most of the brain areas known to be involved in these tasks have homologous counterparts in humans.

Reduction. It is to be noted that the high data-yield of our techniques permits a significant reduction in the number of animals needed to attain statistical significance in neurophysiological measures. Collecting the same amount of data with more traditional methodologies may require many times more animals.

The number of animals will be determined by power analyses which will take the expected experimental yield of our techniques in terms of recorded neurons into account.

Refinement The electrophysiological and behavioral techniques employed are established in the lab. Surgeries will employ advanced pain control (see below) and sterility techniques. Implantable devices are engineered (in many cases in-house) to obtain the lowest weight, smallest bulk, and maximum comfort for the animals, and are comparable with the state-of-the-art in the field in this respect. We will continue to refine our surgical techniques and devices, in order to minimize animal discomfort and adverse health consequences, as we have done in the past.

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

All animals will receive intensive pre and postsurgical care including anti-analgesic treatment, daily check of their health status and environmental enrichment.

Anesthesia will be administered under monitoring of vital parameters (spO₂, heart rate).

During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. However, daily periods of social interactions with former littermates can usually be arranged after training.

During this period, animals will be checked daily for their health status and will receive additional food if required.

Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

We use transgenic animals and genetically engineered viral vectors (of low-risk class) according to GGO national regulations, for prevention of human and environmental contamination.

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.

After the surgery the animals are housed in individual cages because of veterinary concerns regarding animal well-being related to allow a short term recovery post-operatively and restrict a long term aggressive behaviour of cage mates towards animal with chronical implant. [Related the behavioral task mild water or food restriction will be applied in individual housing.](#)

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.

Surgeries will require anesthesia and pain relief.

Mice will be anesthetized with injection drugs, e.g. ketamine/ medetomidine or urethane (for non-recovery procedures) or gas (e.g. isoflurane) during surgeries, according to state-of-the-art accepted protocols, developed in collaboration with the IvD and animal facility personnel. Atropine will be administered to support respiratory function during surgeries. Analgesia will be guaranteed with carprofen, meloxicam or other approved agents during and after surgeries.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

Explain why these effects may emerge.

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment. Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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

Breeding: Breeding might cause mild discomfort for breeding animals

Handling stress: animals will be gradually habituated to handling.

Individual housing: During training and recording stages, animals will receive a majority of their daily food requirements during the behavioral session. This might make it necessary to house them individually during this period to ensure equal food availability for all mice in the experiment.

Also, animals are housed individually after implantation operation to avoid cage mates to harm the implant and cause discomfort for the implanted animal.

Recovery from surgery: analgesia, control of temperature, soft food available, continuous monitoring.

Mild food or water restriction: control of weight (never below 90% body weight), restriction only in the hours right before the experiment.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep minimize the occurrence of post-surgical wounds.

Health status of the animals will be checked daily while in training and additional food will be provided if required.

In 65 % of APP/PS1 mice epileptic seizures are observed before the age of 5 months, which are fatal in 10-20% of the cases. In the most severe cases we will have, in consultation with the IvD, assess to exclude the animals from the experiments and consider that a humane endpoint.

In most cases the risk for discomfort is moderate (3) at most, because seizures last for a very short time (about 2-5 seconds, maximum 30 s) and the recovery is normally good, based on behavioural observations. After 6 months of age, the risk for seizures is much more limited.

However, if animal experience a seizure during the recording the animal is release immediately for the recording device to allow full undisturbed recovery.

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.

1) When recovery after surgery is insufficient. In our experience, animals may lose some weight in the days immediately following the surgery. However, it will be considered if the animal shows permanent weight loss (more than 20% of the weight after the surgery for more than 7 days).

2) When there are post-surgical complications, e.g. infection in the incision.

3) If pathogenesis without hope of recovery is determined. Visible signs of pathogenesis will be monitored such as infection, and condition of the fur. The following will be considered as signs of unhealthy state of the animal:

Aberrant behavior (e.g. freezing)

Shock

Dehydration

Weight loss

Nose and Mouth discharge

Bleeding

Fits/ Seizures as described previously

Diarrhea

Should these unhealthy symptoms appear we will contact the vet to examine possible causes and monitor the animal closely to observe any improvement or decline in the condition of the animal. The vet will be consulted to judge the likelihood of recovery given the nature of the symptoms and their development. If recovery is judged unlikely or to involve prolonged suffering, then the humane endpoint will be reached.

4) When electrophysiological readings show that the head-plate is no longer firmly in place. This will be shown by a disruption of the normally stable background noise and an inability to stably record cells for a number of consecutive sessions. A recovery operation is then no longer possible.

5) when the animal is not learning the behavioral task after repeated attempts. Even if there is no worse discomfort conditions than foreseen, the experiment will be terminated, to prevent pointless manipulation

Indicate the likely incidence.

1: <10%

2: <5%

3: <5%

4: <5%
5: <5%

total < 30%

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).

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

Breeding: Mild, breeding animals

Handling stress: mild, groups 1-8

Injection: mild, groups 1-8

Surgery and recovery: moderate groups 1-4, severe groups 5-8

Cumulative discomfort: moderate groups 1-4, severe groups 5-8

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.

The animal will be killed as part of the procedure to allow us to perform perfusion and histological analysis.

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

T.a.v. [REDACTED]

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
AVD1030020171327

Bijlagen

2

Datum 7 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 april 2017. Het gaat om uw project "Alzheimer's disease and hyperactivity". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171327. 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:

7 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171327

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
7 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171327

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 29
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
7 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171327

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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: 8 mei 2017
Geplande einddatum: 7 mei 2022
Titel project: Alzheimer's disease and hyperactivity
Titel niet-technische samenvatting: Hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

7 april 2017

Datum:

7 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171327



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN

[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171327

Bijlagen

2

Datum 7 april 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 7 april 2017

Vervaldatum: 7 mei 2017

Factuurnummer: 171327

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: [REDACTED]

projectnummer: 2016-0098 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171327	€ 1.287,00

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0098
2. Titel van het project: Alzheimer's disease and hyperactivity
3. Titel van de NTS: Hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 20-01-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 07-02-2017 en 07-03-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-02-2017 tot 18-02-2017, en van 13-03-2017 tot 15-03-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 18-02-2017 en 15-03-2017
 - advies aan CCD: 06-04-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 13-02-2017
 - Datum antwoorden: 18-02-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:
 - General information**
 - 1.3 AD graag voluit schrijven.
 - Antwoord: Corrected*
 - Project Proposal:**
 - 3.1 Het verband tussen amyloïde plaques, hyperactiviteit en geheugenstoornissen is nog niet vastgesteld. Er zijn meerdere hypothesen die dit verband beschrijven. Het zou bijvoorbeeld zo kunnen zijn dat de amyloïde plaques leiden tot hyperactiviteit van hersencellen die vervolgens leidt tot aantasting van het geheugen. Het zou ook kunnen dat de hyperactiviteit aan de basis staat van zowel aantasting van het geheugen als plaquevorming. Een aantal onderzoekers is er van overtuigd dat de plaques niet belangrijk zijn voor het ontstaan van de ziekte van Alzheimer, omdat een interventie gebaseerd op het tegengaan van plaquevorming geen effect had op de ziekte. Zal de aanvrager onderzoeken of de plaques verantwoordelijk zijn voor de geheugenstoornis? De onderzoekers melden dat zij

hun hypothesen zullen onderzoeken in een muismodel, maar welke hypothesen zij bedoelen is nog onvoldoende benoemd.

Antwoord: We have provided some additional information concerning the role of amyloid pathology and hyperactivity, see sections 3.1. and 3.2. . This project is focused on abnormal hyperactivity in single cell and neuronal network level. It seems that this activity is most severe during pre-plaque phase even before cognitive decline. However, the role of abnormal activity during plaque phase is still under investigation and this project aims to also characterize abnormal activity during plaque phase. However, manipulation of amount of amyloid load and whether this has an effect on cognitive decline or memory problems is not in the scope of this project.

-3.1 De onderzoekers noemen enkele publicaties waaruit een verband tussen abnormale excitatoire neuronale activiteit (hyperactiviteit) en de ziekte van Alzheimer zou kunnen blijken. Zijn er geen gegevens over het optreden van epilepsie bij patiënten met de ziekte van Alzheimer? Is de hyperactiviteit ooit gemeten bij patiënten met deze ziekte? Verwachten de onderzoekers dat dit bij alle patiënten met Alzheimer optreedt, of bij een specifiek deel van de patiëntenpopulatie?

Antwoord: We have provided additional information concerning the translational value of this project in the section 3.1. Shortly, the correlation of AD related amyloid pathology and epilepsy is based on epidemiological data showing that patients with aMCI who had epilepsy presented with symptoms of cognitive decline even 7 years earlier than patients with aMCI who did not have epilepsy. Additionally, patients with AD who had epilepsy presented with cognitive decline 6 years earlier than patients with AD who did not have epilepsy. In addition, it has been shown that EEG of AD patients shows epileptiform activity and also fMRI studies support this notion showing increased activity in the hippocampal region.

-3.1 Een kale opsomming van technieken hoort niet thuis in dit onderdeel. In het onderdeel strategie kunnen de onderzoekers uiteenzetten hoe zij de doelstelling van de projectaanvraag operationaliseren.

Antwoord: This part has now been moved to the section 3.4.1.

-3.2 De onderzoekers noemen geen concreet doel van de projectaanvraag, waardoor de commissie niet kan toetsen of dit haalbaar is binnen de looptijd van het project. Welk 'comprehensive picture' bedoelen de onderzoekers? De DEC kan niet goed beoordelen of dit doel behaald kan worden door het uitvoeren van de beschreven experimenten. Het blijft bijvoorbeeld onduidelijk in welke hersengebieden de onderzoekers geïnteresseerd zijn en welke hypothesen zij willen onderzoeken (zie ook de vraag over 3.1). Relevante publicaties van de projectleider ontbreken bij de onderbouwing van de haalbaarheid.

Antwoord: The section 3.2. addressing this issue has now been rewritten and also section 3.1. has been rewritten related to the aims of this project. Additional references have been added to the application.

-3.3 De onderzoekers worden verzocht het maatschappelijk en wetenschappelijk belang beter toe te lichten. Welke in de praktijk bruikbare biomarkers verwachten zij te kunnen identificeren in dit onderzoek aan dit muismodel?

Antwoord: Section 3.3. has now been provided with additional information. As early biomarkers we mention the possibility to find EEG and/or MEG biomarkers for the early detection of AD.

-3.4.1: De onderzoekers zullen zowel jonge als oude dieren onderzoeken. Het is niet duidelijk waarom dit nodig is voor het bereiken van de doelstelling van het project: dit wordt niet genoemd bij 3.2.

Antwoord: The issue of using different age animals in this project has now been addressed in the section 3.4.1. Shortly, younger preplaque animals show the most severe abnormal neuronal activity, on the hand, older animals with amyloid plaques show cognitive and memory dysfunction. Therefore, characterization of neuronal activity and the mechanism of

action of different manipulations at different ages provide complementary picture hyperactivity during amyloid accumulation.

-3.4.2: Welke hersengebieden worden getarget? Is de keuze gebaseerd op uitkomsten van DAP1?

Antwoord: We have provided more detailed information of the brain areas mainly focused. The areas are originally selected based on our previous results and literature being the most important brain areas of cognitive functions and also affected by the amyloid related hyperactivity. During the project with more detailed characterization of single cell and neuronal network activity we will select from original brain areas only the areas which seems to be mostly affected by amyloid accumulation. See the section 3.4.1.

-3.4.2: Het project kent meerdere verschillende doelen die echter nergens worden benoemd. Welke doelen bedoelt de aanvrager (zie ook de vraag over 3.2)? Deze doelstellingen zijn in principe de aanknopingspunten voor de experimenten die uitgevoerd zullen worden. In de figuur staan nu alleen technieken, maar niet de verschillende onderzoeksstappen die nodig zijn voor het behalen van het einddoel. In figuur twee (onderdeel 3.4.3) wordt een overzicht gepresenteerd van de technieken die op verschillende onderzoeksgroepen worden toegepast. Het blijft onduidelijk waarom het toepassen van deze technieken zal leiden tot het bereiken van de doelstelling van het project.

Antwoord: The terminology has been corrected throughout the text and clear objectives are now provided in the section 3.2. A new table explain the work packages derived from the objectives has been added with go-no-go-criteria, see table 1.

-3.4.3: Bij onderdeel 3.4.2 is sprake van 'goal one' en 'goal two'. Worden de resultaten uit 'goal one' gebruikt voor het design van de experimenten voor 'goal two'? De criteria op grond waarvan het project wel of niet zal worden gecontinueerd zijn niet duidelijk vermeld.

Antwoord: See the previous comment.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-A: De geheugentaken die de onderzoekers zullen gebruiken zijn nog niet gespecificeerd.

Antwoord: The memory tasks used in this project has now been described, see section A.

-A: Welke hersengebieden willen de onderzoekers bestuderen?

Antwoord: This part has been added, see section A and 3.4.2

-A: De beschrijving van de experimenten in deze bijlage is erg algemeen gehouden. De commissie kan op basis hiervan niet goed inschatten wat elk dier zal ondergaan. Wellicht kan een figuur of tabel duidelijk maken wat er in de onderscheiden onderzoeksgroepen met welke technieken onderzocht zal worden, welke handelingen (bijv. hoeveel operaties!) de dieren zullen ondergaan en welk cumulatief ongerief dit voor de dieren in de verschillende groepen zal opleveren.

Antwoord: A more detailed description of this part has been added already in the general part, see sections 3.1. and 3.2. In addition, a new table with detailed information has been added, see table 2.

-A2: Het geven van voedsel of water dat eerder is achtergehouden om het dier te motiveren, is niet echt op te vatten als een beloning.

Antwoord: The term reward is removed from the text.

-A2: Hersteloperaties zijn niet gebruikelijk bij muizen.

Antwoord: Clarified the text. If animals implant is severely damaged, no reversal operation will be conducted.

-B: Worden dieren van beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt?

Antwoord: Corrected. Only males.

-B: In de tabel is sprake van 2 operaties, terwijl in de tekst wordt vermeld dat er maximaal 3 operaties zullen plaatsvinden. S.v.p. in overeenstemming brengen met elkaar.

Antwoord: This has been corrected. See tables 2 and 3.

-B: De fokdieren met ongerief die nodig zijn om experimentele dieren te verkrijgen dienen in elke bijlage opgenomen te worden.

Antwoord: This has been corrected. Appendix 1 (head fixed) 150 male tg mice, and appendix 2 (freely moving) 350 tg males.

-C: De vraag betreft hergebruik van dieren uit een andere vergunning. Alle dieren zullen matig ongerief ondervinden van de operatie, dus het is onduidelijk wat de onderzoekers met deze opmerking bedoelen.

Antwoord: This comment has been removed.

-I: De onderzoekers zullen behalve voedselrestrictie misschien waterrestrictie gebruiken. Dit laatste is hier niet vermeld.

Antwoord: Water restriction added.

-I: De individuele huisvesting (zoals gemeld bij D2) ontbreekt bij de opsomming. En de reden voor individuele huisvesting in DAP2 (onderdeel F) is niet helder omschreven.

Antwoord: Individual housing added with more clarification.

-K: Het ongerief door het fenotype van de dieren is niet adequaat beschreven. Bovendien veroorzaken handelingen met de APdE9 muizen meer ongerief omdat deze dieren stressgevoeliger zijn. Hoe verwacht de onderzoeker dat dieren met dit fenotype zich gedragen tijdens zo'n experiment? Wat gebeurt er wanneer een muis een seizure krijgt in de meetopstelling?

Antwoord: The breeding of these animals is done in the house by a group of multiple years of experience. We are using the same breeding protocols also in this project. These animals show slight hyperactivity and might be more vulnerable to stress. Therefore, these animals are handled throughout the whole project by experienced researchers with even 10 years of experience of this mouse model. We take this detail into account in all steps of the experiments and adjust the procedures accordingly if needed. Description of the procedure in case of seizure during recording has been added, see section I.

-K: De commissie is van mening dat het ongerief voor de dieren die 2-3 maal een stereotactische operatie ondergaan in combinatie met de overige handelingen ernstig is.

Antwoord: The categorization of the severity has been corrected.

***DAP2**

De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen voor DAP1 ook van toepassing zijn voor DAP2.

Antwoord: All the previous questions and comments have also been addressed accordingly in the appendix 2.

Niet-technische samenvatting:

-1.1: De titel past onvoldoende bij de projectaanvraag.

-3.2: S.v.p. aanpassen in overeenstemming met de herziene tekst n.a.v. de vraag van de commissie

-3.4: Transgene dieren zouden ongerief kunnen hebben (i.p.v. mogen).

-3.5 De commissie verzoekt u de tweede zin te verwijderen.

-4.3: De commissie meent dat de onderzoekers niet van plan waren om dit bij apen te onderzoeken. Zij raadt hen aan de laatste zin te schrappen.

-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: This section has been corrected and the changes in the other parts have also been addressed by help of a native Dutch speaking person.

- Datum vragen: 13-03-2017

- Datum antwoorden: 15-03-2017

Description of Animal Procedures:

-B: Waarom willen de onderzoekers alleen mannetjes gebruiken? De onderbouwing hiervoor ontbreekt nog.

See correction in the 3.4.2. "The experiments are conducted in male mice. The scope of this research is not in the role of hormonal effect on the AD pathology. Because there is gender differences in amyloid burden accumulation and overall AD pathology is strongly linked to the fluctuation in the estrus cycle, we will not use female mice (24, 25)."

See also additional references 24 and 25.

-B: De vraag over het aantal operaties is nog niet adequaat beantwoord. In de tekst (onderdeel A2) worden nog steeds 3 operaties genoemd, terwijl in tabel 2 sprake is van 1 of 2 operaties.

The figure has been corrected accordingly and number of operation is now emphasized.

Niet-technische samenvatting:

- De vragen van de commissie over de NTS zijn niet beantwoord, en de aanpassingen in het project zijn nog niet doorgevoerd in de NTS.

There seems to be misunderstanding. These issues have been considered in the public summary even though in the process the labelling of corrections is missing. However, now the corrections have been marked as red.

Just to make sure and clear, I also comment the changes done in the previous version in this cover letter.

-Onderdeel 3.1 begint met een vraag die de commissie niet kan plaatsen.

The questions has been removed.

-1.1: De titel past onvoldoende bij de projectaanvraag.

The headline has been corrected "Hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer"

-3.2: S.v.p. aanpassen in overeenstemming met de herziene tekst n.a.v. de vraag van de commissie

This section has been corrected accordingly ("van biomarkers (electroencephalography en magnetoencephalography).").

-3.4: Transgene dieren zouden ongerief kunnen hebben (i.p.v. mogen).

Indication of plausible epileptic seizures has been added.

-3.5 De commissie verzoekt u de tweede zin te verwijderen.

This has been deleted

-4.3: De commissie meent dat de onderzoekers niet van plan waren om dit bij apen te onderzoeken. Zij raadt hen aan de laatste zin te schrappen.

This mention has been removed

- 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.

The overall coherence of the text has been checked.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is 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 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. 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. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. 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 doelcategorieën zijn niet geheel in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De onderzoekers geven aan dat het translationeel onderzoek is, maar de commissie vindt dit discutabel. Het veronderstelde verband tussen hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer is immers nog niet onomstotelijk vastgesteld.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de link tussen elektrische activiteit en geheugen in kaart brengen. De doelen van het onderzoek zijn: bepalen hoe hyperactiviteit en epilepsie-achtige activiteit de twee geheugen-gerelateerde netwerken (corticothalamisch en intra-hippocampal) aantasten; het tegengaan van de hyperactiviteit in deze netwerken op verschillende manieren (farmacologisch, optogenetisch, farmacogenetisch of elektrisch); het effect van het onderdrukken van pathologische hyperactiviteit op cognitieve functies onderzoeken. Het uiteindelijke doel is de identificatie van nieuwe biomarkers (EEG en/of MEG markers) die gebruikt kunnen worden voor vroege diagnose van de ziekte van Alzheimer, en voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingen. Het veronderstelde verband tussen hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer is nog niet onomstotelijk vastgesteld. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de relatie tussen amyloïde plaques, epilepsie-achtige hersenactiviteit en geheugenstoornissen op dit moment zeer beperkt is, en dat meer kennis op termijn mogelijk kan bijdragen aan vroege diagnostiek en behandelmogelijkheden voor de ziekte van Alzheimer. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd 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 en de samenleving is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan vroegere diagnostiek en nieuwe behandelmogelijkheden voor de ziekte van Alzheimer. Vroege diagnostiek en behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan wellicht bijdragen aan behoud van de geheugenfunctie en aan langer behoud van de zelfstandigheid van oudere mensen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt een betere kwaliteit van leven heeft. Het kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige verouderingsziekten, zoals de ziekte van Alzheimer, is van groot belang voor de vergrijzende samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

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 geclassificeerd. Het ongerief voor de dieren wordt vooral veroorzaakt door meerdere stereotactische operaties in combinatie met de overige handelingen. Het ongerief is juist ingeschat als licht voor 39% van de dieren (fokdieren die ongerief vanwege hun fenotype ondervinden), matig voor 33% van de dieren en ernstig voor 28% van de dieren.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast doordat er een 'headpost' wordt aangebracht op de kop van het dier waarmee de kop kan worden gefixeerd en elektroden/optische vezels kunnen worden aangesloten op apparatuur. In de hersenen van de transgene dieren ontstaan plaques en zij hebben vaak epileptische aanvallen. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af.
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 eerdere ervaring met dit diermodel en met deze experimenten ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het is op dit moment niet mogelijk om de relatie tussen gedrag, leren, neurale code, en invloed van genen hierop te bestuderen zonder proefdieren. De onderzoekers maken voor het beantwoorden van andere onderzoeksvragen regelmatig gebruik van computermodellen, maar dat is voor deze onderzoeksvragen niet mogelijk.
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. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggewijze experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Door de gebruikte technieken worden veel data verkregen van elk proefdier. Er zijn daardoor minder dieren nodig voor het verkrijgen van betrouwbare neurofysiologische metingen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Knaagdieren zijn de minst complexe diersoorten die ingewikkelde geheugentaken kunnen uitvoeren. De hersengebieden die hierbij betrokken zijn hebben homologen bij de mens, waardoor de resultaten makkelijker vertaalbaar zijn. De gebruikte testen zijn de minst belastende voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. 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 zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "Hormonale effecten op AD pathologie zijn geen onderwerp van studie. Aangezien er geslachtsverschillen zijn in accumulatie van amyloïd en de algemene AD pathologie sterk gelinkt is aan de fluctuaties in de oestrus cyclus zullen we geen vrouwelijke muizen gebruiken." 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 het 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, matige of ernstige 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 de samenleving/patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het meer kennis zal opleveren over de relatie tussen epilepsie-achtige hersenactiviteit en geheugenstoornissen. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Het veronderstelde verband tussen hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer is nog niet onomstotelijk vastgesteld. Wanneer dat verband inderdaad kan worden aangetoond dan opent dat op termijn nieuwe mogelijkheden voor de ontwikkeling van vroege diagnostiek en behandeling van de ziekte van Alzheimer. Deze ziekte komt veel voor en heeft een grote impact op de patiënten en hun directe omgeving. Een therapie om het ziekteproces substantieel te vertragen, te stoppen of om te keren is nog niet voor handen. De kennis die wordt vergaard met dit project kan bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor deze mensen. De commissie acht meer kennis over het verband tussen hyperactiviteit en de ziekte van Alzheimer van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: de link tussen elektrische activiteit en geheugen in kaart brengen. Het uiteindelijke doel daarvan is de identificatie van nieuwe biomarkers (EEG en/of MEG markers) die gebruikt kunnen worden voor vroege diagnose van de ziekte van Alzheimer, en het ontwikkelen van nieuwe behandelingen. 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

X 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.

AVD103002017327-Antwoord-(2016-0098-20-04-2017)

I would like to thank you for this valuable comments. Please find the attached comments and corrections

Additional comment

First, I would like to you to correct an unfortunate error in the section “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.”

The total amount of animals is stated as 1310 twice even though the correct number is 1170.

Comments to the first point concerning the re-use.

Here by re-use we intended the use of previously implanted animals in a different behavioral test. No new surgical intervention will be operated on these animals.

In this sense, no new experiment will ever be performed on animal experiencing severe discomfort. All behavioral manipulation will be clearly specified in the work protocol and will comply with the stipulations in the CCD project 2016-0098, in terms of duration, number of experimental days, etc.

Comments to the second point concerning the housing

The paragraphs “Accommodation and care” are now identical in both descriptions of animal procedures. We also added the following sentence” Related the behavioral task mild water or food restriction will be applied in individual housing.”

Comments to the third point concerning the use of males instead of females

We have added to the section “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.” The following sentence as blue
 “Based on these considerations we think that a full study of gender differences, while interesting, is beyond the scope of the current project because it involves studying correlation of neural effect with a new variable, estrogen level, which require a different experimental design.”

But see also the following explanation.

Indeed it is commonly accepted that, in the APPswePS1dE9 mouse model, $A\beta$ burden of aged females appears to be more severe than in old males (1-4). However, this does not only apply to aged animals but also younger mice. In 4-month old APPswePS1dE9 mice, brain $A\beta$ load has been reported to be dominated by $A\beta_{1-40}$ rather than $A\beta_{1-42}$ (1,2). Upon 6 months of age, $A\beta$ ratio shifts towards $A\beta_{1-42}$ that is maintained until end of life. Furthermore, a recent study showed that senile plaques in cortex and hippocampus can be detected in 3-month-old males but barely in females of the same age which means that $A\beta$ plaques occur earlier in males (5).

Based on the accumulation of different proportion of amyloid forms in different ages and between genders it has been noted that in the age of 4 month males Abeta40 level is 71.1 ± 2.5 ng/g compared to female 89.9 ± 3.2 ng/g, and the same difference is also seen in Abeta42 level, male 15.4 ± 1.8 vs. female 27.5 ± 2.2 (mean \pm SEM). However, in the age of 12 months Abeta40 levels in male is 1432 ± 512 ng/g and in females 4585 ± 1451 ng/g, and Abeta 42 levels in males 3564 ± 993 ng/g and in females 9566 ± 2249 ng/g (2). However, it has to be noted that even though one of these Abeta levels or the ration of Abeta40/Abeta42 could be likely linked to the observed neuronal hyperactivity, we have shown that amount of epileptic seizures is reduced already in the 15-18 weeks when levels of soluble forms of amyloid still increasing (7). It has to be also noted that we have observed hyperactivity in brain areas which do not show amyloid accumulation (6). To conclude, gender differences in soluble form of amyloid are not reliable predictor of observed neuronal hyperactivity.

To my knowledge, there is currently only one study focusing on the gender difference in amyloid related hyperactivity (8). In this study the researchers focused only to hippocampal activity instead thalamocortical connections which we have shown to be mostly affected in young animals (6). In addition, in this study hyperactivity was only registered as seldom occurring spikes and changes in overall brain oscillations. Also, the findings were mainly compared as wild type vs. transgenic mice both in female and male groups making comparison between genders difficult. Therefore, the results were rather mixed. For instance, spike train duration showed that in the age 14 week male transgenic animals have longer spike train duration than wild type males (0.6 ± 0.3 vs. 0.1 ± 0.01 min). However, there was no difference in female transgenic and wild type animals (0.3 ± 0.3 vs 0), and based on my own analysis of their results there was no difference between genders in this age group (14 weeks). However, already in the age 15 week there is a difference between female wild type mice (0.1 ± 0.01) and transgenic females (0.3 ± 0.1) but not any more in male. My own analysis didn't show any differences between genders. However even though there are no difference between wild type and transgenic animals either in male or female groups it seems that there is a gender difference in age 19 weeks in transgenic animals (male 0.4 ± 0.2 vs. female 1.2 ± 0.4). But as said this only applies in spike train duration and not in amount of single spikes which is another main parameter in this experiment while determining the hyperactivity related to amyloid accumulation in different genders.

In summary, it is obvious that there are differences in the amyloid accumulation between the genders in this transgenic animal strain. However, the results correlating gender to amyloid related activity have so far been sparse and rather mixed.

Most likely above mentioned facts are related to development of brain and/or differential expression of estrogen/testosterone effects in the neuronal activity and progression of amyloid pathology. This is noted not only in the epidemiological studies (e.g. 9) but also animal models of amyloid accumulation (e.g.10, 11). Therefore, if we wanted to study the proposed amyloid related hyperactivity also in females we would need separated groups for males and females both of which would have transgenic and control animal groups. Therefore, the total amount of animals would be $770 \times 2 = 1540$. If the estrogen level during amyloid pathology is one of the key factors for hyperactivity we would also need to control the stage of the estrous cycle of the mouse (4 stages) with individual groups making the amount of females needed in the actual experiments (not in breeding) ($770 \times 4 = 3080$ in addition to males 770 (12).

Based on these considerations we think that a full study of gender differences, while interesting, is beyond the scope of the current project because it involves studying correlation of neural effect with a new variable, estrogen level, which require a different experimental design. This is definitely an interesting question, but one that needs a dedicated study, for which new personnel and financial resources need to be acquired.

1. Garzia-Alloza et al. Neurobiology of Disease 2006
2. Wang et al. Neurobiology of disease 2003
3. Ordonez-Gutierrez et al. Journal of Alzheimer's disease 2016
4. Jiao et al. Neurotoxicity Research 2016
5. Ordonez-Gutierrez et al. Journal of Alzheimer's disease 2015
6. Gurevicius et al. Cerebral cortex 2013
7. Minkevience et al Journal of Neurocience 2009
8. Papazoglou et al. Neural plasticity 2016
9. Mielke et al. Clinical Epidemiology 2014
10. Carroll et al. Brain Research 2011
11. Placanica et al. PLoS One 2009.
12. Byers et al. PLoS One 2012

Geachte [REDACTED]

We hebben vandaag telefonisch contact gehad over enkele onduidelijkheden in uw aanvraag met nummer AVD1030020171327 en titel 'Alzheimer's disease and hyperactivity'. Deze betreffen het hergebruik, de afwijkende huisvesting van de dieren en het gebruik van alleen mannelijke dieren.

1) In de aanvraag staat dat dieren worden hergebruikt in andere gedragstesten. Indien voor deze gedragstesten dezelfde chirurgische ingreep nodig is en de testen onder dezelfde onderzoeksvraag vallen is er geen sprake van hergebruik. Indien een willekeurig ander dier met een andere chirurgische ingreep voor die andere gedragstesten zou kunnen worden gebruikt, dan is er sprake van hergebruik. In dit geval is wettelijk verboden om dieren die in een eerder experiment of in het huidige experiment ernstig ongerief ervaren te hergebruiken.

Artikel 1e,lid 1 van de Wod:

1. Wanneer bij een dierproef ook een dier kan worden gebruikt waarop nog niet eerder een dierproef is verricht, wordt slechts een dierproef verricht met een dier dat al eerder in een dierproef is gebruikt, indien voldaan is aan de volgende voorwaarden:

- a. de werkelijke ernst van pijn, lijden, angst of blijvende schade waarmee de voorgaande dierproeven gepaard gingen «licht» of «matig» was;
- b. vastgesteld is dat de algemene gezondheids- en welzijnstoestand van het dier volledig is hersteld;
- c. de volgende dierproef op basis van [artikel 10b](#) is ingedeeld in de categorie: «licht, «matig» dan wel «terminaal»; en
- d. de te verrichten handeling in overeenstemming is met diergeneeskundig advies, bij de totstandkoming waarvan rekening wordt gehouden met de volledige levensloop van het dier.

We verzoeken u om duidelijk aan te geven of inderdaad in dit project sprake is van hergebruik. Zo ja, dan mag geen sprake zijn van ernstig ongerief (aangegeven in de huidige versie van de bijlage dierproeven 1). Zo nee, dan graag de bijlages dierproeven aanpassen.

2) In de aanvraag wordt vermeld dat dieren mogelijk individueel worden gehuisvest wegens voedsel- of waterrestrictie en de implantaten. Deze informatie is gedeeltelijk in bijlage dieproeven 2 onder punt F vermeld, maar ontbreekt in bijlage dierproeven 1 onder F. Zou u dit willen aanpassen?

3) U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen inzetten omdat er geslacht-specifieke verschillen zijn. De CCD zou graag willen weten hoe groot deze verschillen zijn en tot hoeveel extra dieren zou het gebruik van beide geslachten leiden. We verzoeken u deze informatie bij ons in te dienen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen behandelen ontvangen we uw reactie graag uiterlijk **donderdag, 20 april 2017**.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 280028

E: info@zbo-ccd.nl



Van: [Redacted]
Verzonden: dinsdag 25 april 2017 14:01
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: FW: NTS aanvraag AVD1030020171327
Bijlagen: NTS AVD1030020171327 vs 2.pdf

Beste [Redacted]
 Nadat ik de vorige versie had verstuurd kreeg ik nog een reactie van de onderzoeker, dat de aantallen in sectie 3.3 correct waren, ipv de aantallen in sectie 3.5. Ik heb dit nu aangepast. Hierbij de laatste versie, en mijn excuses voor de verwarring.
 Hartelijke groet,
 [Redacted]

Van: [Redacted]
Verzonden: dinsdag 25 april 2017 13:38
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD1030020171327

Beste [Redacted]
 Excuus, hierbij de nieuwe versie!
 Hartelijke groet,
 [Redacted]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 25 april 2017 13:34
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]

Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD1030020171327

Beste [Redacted]
 Hartelijk dank voor de NTS. Het punt is dat nu verschillende percentages onder 3.3 en 3.5 staan. Omdat bij punt 3.3 wordt naar de diersoorten en aantallen gevraagd, zouden jullie kunnen overwegen om daarin alleen deze informatie te laten en het ongerief en bijhorende percentages onder 3.5 te zetten. Anders graag dezelfde percentages in beide vakjes houden, dubbele tekst dus.
 Ik ontvang graag de aangepaste NTS.
 Met vriendelijke groet,
 [Redacted]

Uitvoeringsexpert
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: [Redacted]

Verzonden: dinsdag 25 april 2017 13:14
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD1030020171327

Beste [Redacted]
 Dank u wel voor de snelle reactie. Hierbij de aangepaste NTS. We zien de beschikking graag tegemoet.
 Hartelijke groet,
 [Redacted]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 25 april 2017 13:06
Aan: [Redacted]
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD1030020171327

Beste [Redacted]
 De NTS kan ook per email worden gestuurd, maar als jullie het liever via de NetFTP willen sturen is morgen ook goed.
 De CCD heeft de aanvraag besproken, maar de beschikking kan niet naar jullie toe worden gestuurd voordat we de nieuwe NTS hebben ontvangen.
 Met vriendelijke groet,
 [Redacted]

Uitvoeringsexpert

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]

Verzonden: dinsdag 25 april 2017 12:11

Aan: info@zbo-ccd.nl

Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD1030020171327

Beste [REDACTED]

Dank u wel voor de mail en het attenderen op deze fout in de NTS. We hebben het gewijzigd, maar ondervinden problemen bij het uploaden. Bij documenten die onze secretaresse eerder vandaag probeerde te uploaden kregen we al een foutmelding, nu kan ze überhaupt niet meer uploaden. Is het een probleem als de aangepaste NTS morgen jullie kant op komt, of zal ik deze via mail aan jullie sturen?

Hartelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

www.radboudumc.nl

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Verzonden: dinsdag 25 april 2017 9:31

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: NTS aanvraag AVD1030020171327

Geachte [REDACTED]

In de NTS horend bij de aanvraag AVD1030020171327 staat onder punt 3.3 dat dieren licht, matig of ernstig ongerief ervaren, maar onder punt 3.5 staat dat 'Het ongerief zal matig zijn voor alle dieren.'

Zou u dit willen aanpassen en een nieuwe NTS zo snel mogelijk naar ons toe sturen?

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort totdat we de nieuwe NTS hebben ontvangen.

Alvast hartelijk dank.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.

The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.

The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 19 april 2017 11:46
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD1030020171327
Categorieën: Dossier: Andreea

Beste [REDACTED]

In overleg met de voorzitter van de RUDEC kom ik tot het volgende antwoord op uw vraag.

In de EU-richtlijn staat in de Algemene Bepalingen Artikel 33 (**Verzorging en huisvesting**):

1. Wat betreft de verzorging en de huisvesting van de dieren dragen de lidstaten er zorg voor dat:

a) alle dieren huisvesting, een omgeving, voedsel, water en verzorging ontvangen die passend zijn voor hun gezondheid en welzijn;

b) iedere inperking van de mogelijkheid van de dieren om aan hun fysiologische en ethologische behoeften te voldoen, tot een minimum wordt beperkt;

c) de omgevingsomstandigheden waarin de dieren worden gefokt, gehouden of gebruikt, dagelijks worden gecontroleerd;

d) regelingen worden getroffen om een eventueel letsel of pijn, onnodig lijden, angst en blijvende schade die vermijdbaar zijn en die worden ontdekt, zo snel mogelijk te verhelpen, en

e) de dieren onder behoorlijke omstandigheden worden vervoerd.

2. Met het oog op het bepaalde in lid 1, zorgen de lidstaten ervoor dat de in bijlage III omschreven verzorgings- en huisvestingsnormen worden toegepast met ingang van de in die bijlage gespecificeerde data. NL 20.10.2010 Publicatieblad van de Europese Unie L 276/

3. De lidstaten kunnen om wetenschappelijke redenen, of redenen van dierenwelzijn of diergezondheid afwijkingen van lid 1, onder a), en lid 2 toestaan.

Uit punt 3 blijkt dat om wetenschappelijke reden of redenen van dierenwelzijn afgeweken kan worden van 'normale' huisvesting. De individuele huisvesting van dieren om te voorkomen dat hun headpost beschadigd wordt door een kooigenoot en om voedselinname te kunnen controleren is in onze ogen dus niet afwijkend van hetgeen in de richtlijn staat.

In bijlage III wordt hier ook naar verwezen: Met uitzondering van de soorten die van nature solitair zijn, moeten dieren in sociaal verband worden gehuisvest in stabiele groepen van compatibele individuen. In gevallen van afzonderlijke huisvesting op grond van artikel 33, lid 3, moet de duur van de afzondering tot het noodzakelijke minimum worden beperkt en moet het visuele, auditieve, olfactorische en/of tactiele contact worden gehandhaafd. De introductie of herintroductie van dieren in bestaande groepen moet zorgvuldig in het oog worden gehouden, teneinde problemen als gevolg van onverenigbaarheid of verstoorde sociale relaties te vermijden.

Dieren die individueel gehuisvest zijn hebben wel visueel, auditief en olfactorisch contact. Hierdoor is de individuele huisvesting van de dieren volgens de RUDEC conform de eisen in bijlage III van de richtlijn.

Graag hoor ik of de CCD het eens is met deze redentatie.

Onlangs heeft u dezelfde vraag gesteld over een advies dat de RUDEC heeft uitgebracht voor een andere projectaanvraag (AVD103002017872). Daar heeft u op 9-3-2017 een vergelijkbaar antwoord opgekregen (inclusief het verzoek om feedback), maar wij hebben daar geen feedback over ontvangen. Deze zouden wij op prijs stellen, mede gezien het feit dat u dezelfde vraag nogmaals stelt.

Vriendelijke groeten,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: donderdag 13 april 2017 17:49

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD1030020171327

Geachte RUDEC,

Op 6 april 2017 heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel 'Alzheimer's disease and hyperactivity' en nummer AVD1030020171327.

In uw advies bij vraag C10 geeft u aan dat de huisvesting van de dieren volgens bijlage III van de richtlijn is. De aanvrager meldt in de aanvraag dat de dieren mogelijk individueel worden gehuisvest. Hoewel de reden hiervoor onderbouwd is, wijkt de huisvesting van eisen in bijlage III af. We zouden graag willen weten hoe u hiernaar heeft gekeken.

We ontvangen uw reactie graag uiterlijk donderdag 20 april 2017.

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:

1) In de aanvraag staat dat dieren worden hergebruikt in andere gedragstesten. Indien voor deze gedragstesten dezelfde chirurgische ingreep nodig is en de testen onder dezelfde onderzoeksvraag vallen is er geen sprake van hergebruik. Indien een willekeurig ander dier met een andere chirurgische ingreep voor die andere gedragstesten zou kunnen worden gebruikt, dan is er sprake van hergebruik. In dit geval is wettelijk verboden om dieren die in een eerder experiment of in het huidige experiment ernstig ongerief ervaren te hergebruiken.

Artikel 1e, lid 1 van de Wod:

1. Wanneer bij een dierproef ook een dier kan worden gebruikt waarop nog niet eerder een dierproef is verricht, wordt slechts een dierproef verricht met een dier dat al eerder in een dierproef is gebruikt, indien voldaan is aan de volgende voorwaarden:

- a. de werkelijke ernst van pijn, lijden, angst of blijvende schade waarmee de voorgaande dierproeven gepaard gingen «licht» of «matig» was;
- b. vastgesteld is dat de algemene gezondheids- en welzijnstoestand van het dier volledig is hersteld;
- c. de volgende dierproef op basis van [artikel 10b](#) is ingedeeld in de categorie: «licht, «matig» dan wel «terminaal»; en
- d. de te verrichten handeling in overeenstemming is met diergeneeskundig advies, bij de totstandkoming waarvan rekening wordt gehouden met de volledige levensloop van het dier.

We verzoeken u om duidelijk aan te geven of inderdaad in dit project sprake is van hergebruik. Zo ja, dan mag geen sprake zijn van ernstig ongerief (aangegeven in de huidige versie van de bijlage dierproeven 1). Zo nee, dan graag de bijlages dierproeven aanpassen.

2) In de aanvraag wordt vermeld dat dieren mogelijk individueel worden gehuisvest wegens voedsel- of waterrestrictie en de implantaten. Deze informatie is gedeeltelijk in bijlage dierproeven 2 onder punt F vermeld, maar ontbreekt in bijlage dierproeven 1 onder F. Zou u dit willen aanpassen?

3) U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen inzetten omdat er geslacht-specifieke verschillen zijn. De CCD zou graag willen weten hoe groot deze verschillen zijn en tot hoeveel extra dieren zou het gebruik van beide geslachten leiden. We verzoeken u deze informatie bij ons in te dienen.

Indien u ook hierop wil reageren horen we het graag uiterlijk donderdag 20 april 2017.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



Centrale Commissie Dierproeven

> 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
AVD1030020171327

Bijlagen

1

Datum 25 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Alzheimer's disease and hyperactivity" met aanvraagnummer AVD1030020171327. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 en 24 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. De vragen van de CCD over hergebruik, huisvesting en het geslacht van de te gebruiken dieren zijn beantwoord. De aanvraag is ook 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.

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

U kunt met uw project "Alzheimer's disease and hyperactivity" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 mei 2017 tot en met 7 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Er is sprake van ongeriefcategorie Ernstig.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 april 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 19 april 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft de vraag van de CCD over de huisvesting beantwoord.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

25 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171327

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:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171327



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 8 mei 2017 tot en met 7 mei 2022, voor het project "Alzheimer's disease and hyperactivity" met aanvraagnummer AVD1030020171327, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene 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 7 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 6 april 2017, ontvangen op 7 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 en 24 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Circuit manipulations in behavior, head-fixed mice				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wildtype en transgene APPswe en PS1dE9 (APdE9) muislijnen	310	23% Ernstig 45% Matig 32% Licht	
3.4.4.2 Circuit manipulation in freely moving mice				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / gelijk aan 3.4.4.1	860	33% Ernstig 32% Matig 35% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD1030020171327

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1030020171327

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:
AVD1030020171327

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS20171365								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie aanvulling aanvraag			x					
9	Projectvoorstel nieuw				x		x	x	
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	

Arb 1050020171365

1.



Centrale Commissie Dierproeven

13 APR. 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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 10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam Instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	1179037
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1 [Redacted]
		Postbus	[Redacted]
		Postcode en plaats	9713 AV GRONINGEN
		IBAN	NL45ABNA0474567206
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
-

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De ecologie van slaap: nieuwe inzichten op het gebied van slaaphomeostase van EEG studies in ganzen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, ██████████ |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de Instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	GRONINGEN
Datum	11 06 2017
Handtekening	[REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

All mammals and birds appear to spend a large part of their life asleep. It is widely accepted that sleep is homeostatically regulated and that a need for sleep builds up during wakefulness. Yet, despite many theories, the exact function of sleep remains an enigma (Siegel et al. 2005). Moreover, sleep itself is a complex phenomenon consisting of two distinct stages, non-rapid-eye-movement (NREM) sleep and rapid-eye-movement (REM) sleep. Each of these two stages may have its own function in, e.g., neuronal recovery, maintenance and plasticity (Abel et al. 2013). The apparent importance of sleep is supported by numerous studies showing that sleep deprivation leads to a wide array of molecular, cellular, and physiological changes, behavioral disturbances, and cognitive impairments (Kreutzmann et al. 2015). Also, in humans short or disrupted sleep is associated with an increased risk for various diseases, including metabolic diseases, cardiovascular diseases and psychiatric diseases such as depression [REDACTED]. However, much of what is currently being learned about sleep is based on experimentation in a handful of mammalian species (particularly nocturnal rodents) and almost exclusively in tightly controlled laboratory settings (devoid of any ecological demand that characterizes life in the wild). Indeed, field studies to examine sleep under the natural conditions where it evolved have so far been exceptionally rare. In fact, in most ecological studies that assess behavior in the wild, sleep episodes are often little more than blanks in the activity recordings. However, if sleep indeed serves important functions then the time available for sleep or any restrictions herein may very well be a determining factor in the fitness of an individual.

Although the need for field-based studies of sleep has been recognized for decades, technological limitations largely prevented this ecological approach to investigating sleep. However, recent developments and improvements of this technology have now opened the door for sleep research to go wild. Confirming concerns about the interpretation of some laboratory derived data, initial field studies using these new methods revealed pronounced differences in both timing and amount of sleep between conspecifics in the wild and captivity, suggesting that ecological factors can have a strong influence on sleep (Rattenborg et al. 2008).

Birds are a particularly interesting group of animals for studies on the ecology of sleep. Birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Beckers et al. 2015). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, which suggests that sleep supports brain function in birds in a way that is similar to what has been reported for mammals (Beckers et al. 2015). At the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a strong reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al. 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in laboratory rodents that decreased performance and health is an inescapable outcome of sleep loss. However, too few studies like these have been done to draw any firm conclusions. Is there a high tolerance to the consequences of sleep loss in some species during certain phases of the life cycle when time for sleep is limited? Is there a high degree of adaptive plasticity in sleep under natural conditions that is not seen in laboratory rodents?

Long-distance migration is another common phenomenon in birds that is thought to occur at the expense of sleep. Some migrating birds are in flight for many days without pausing to rest and recover. It has been suggested that long-distance migrators may sleep during flight, perhaps unihemispherically as is known from dolphins (Rattenborg et al. 2006) and was recently shown in frigate birds doing multi-day foraging flights over the ocean (Rattenborg et al. 2016). In these cases, one half of the brain occasionally sleeps, while the other half remains awake, perhaps to coordinate movements and orientation. Even so, such unihemispheric sleep may not be as efficient as bihemispheric sleep and the total amount of sleep frigate birds had during flight was minimal. Moreover, the frigate birds gained most of their limited sleep during soaring and gliding flights, a capacity that many other birds do not have. Therefore, these data cry for new studies in other species to answer the question whether birds truly sleep during migration, whether they sleep enough, and how much recovery sleep they need at the end of the migratory flight. Do migrating birds accrue a serious deficit of one sleep stage or another, or do unknown physiological adaptations allow them to temporarily go without sleep?

We here propose to study sleep in brant geese (*Branta bernicla*) and barnacle geese (*Branta leucopsis*), which for several reasons are extremely interesting and suitable for studies on sleep under natural conditions. Most importantly, these geese display huge variation in the timing and amount of activity across the annual cycle, and during some phases the time for sleep appears to be limited. The reproductive phase is particularly interesting in that respect. During that time, the brant geese at our intended study sites in northern Alaska live under the continuous light of the Arctic summer. Barnacle geese migrate to the north of Greenland/Nova Zembla where they live under continuous light as well. The parents of both geese species are continuously busy guarding their nests and their self-foraging young under high risk of predation by, a.o., foxes (Raveling 1989). Another phase of the annual cycle that is of particular interest is the period of migration. However, the timing and duration of migration between the two species are different. The differences in environmental factors could alter sleep homeostasis and architecture for both species. This makes the brant and barnacle appropriate candidates to address the aim of assessing the sleep-wake behaviour, sleep architecture and sleep homeostasis and comparison between these species, with the added advantage that these geese are large enough for mounting of miniature devices without affecting their natural behaviour.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

In the studies described in this application we will assess sleep, sleep homeostasis and consequences of sleep deprivation in brant and barnacle geese under semi-natural conditions in our facility at the University of Groningen. In the available aviaries the geese can be exposed to natural light and temperature for measurements of spontaneous variation in sleep architecture across the seasons; yet, at the same time these aviaries allow for controlled and detailed assessment of homeostatic sleep responses to experimental sleep deprivation of different durations. These studies are important to, A) confirm findings on sleep homeostasis achieved in mammals, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) shed new light on aspects of sleep regulation and sleep homeostasis that may be specific for certain species. Importantly, the findings of species-specific aspects of sleep would fuel the concern that caution is required with extrapolation of results from studies in nocturnal rodents to other species (including humans). Moreover, the studies described in this application also form the necessary prelude to future studies in the wild, which will aim to assess sleep during the reproductive season and during migration when the time for sleep appears to be limited. To be able to interpret such future data on sleep (or a lack of sleep) measured in the field under challenging conditions, we will now first make a detailed assessment of sleep architecture and sleep homeostasis under semi-controlled conditions.

The main aims of the current project are:

1) Assessment of sleep-wake behavior and sleep architecture in brant and barnacle geese by means of polysomnography under semi-natural conditions across the annual cycle (different light conditions, different ambient temperatures). Published data suggest that sleep is sensitive to environmental conditions, including light and temperature, but few systematic studies in species other than nocturnal rodents have been performed and only one study in birds is ongoing at our institute (the European starling).

2) Assessment of the homeostatic sleep response to experimental sleep deprivation of different durations (i.e., the occurrence of a NREM and REM sleep rebounds). It is well established that humans, rats, and mice display a homeostatic response to sleep deprivation, that is, they catch up for lost sleep by showing a rebound sleep. This rebound is particularly clear for NREM sleep but less convincing (and perhaps species-dependent) for REM sleep. However, a careful and quantitative assessment of sleep homeostatic responses has been performed in few species other than the usual mammalian suspects.

Feasibility of the project:

We foresee no problems with the execution of this project. The Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences at the University of Groningen has outstanding facilities for the studies described in this application, including large semi-natural outdoor areas with ponds and a large number of different sized aviaries ideally suited for controlled, experimental studies. Different species of geese have been successfully maintained at our institute for many years. Also, the required equipment for EEG recording and EEG analysis are available at our institute and the applicant has ample experience with these kind of studies in different species. The experiments are integrated in one PhD project. Moreover, the studies are part of an ongoing collaboration with experts in bird migration and ecology within our own institute and with the worlds' leading experts on the phylogeny of sleep and sleep studies in the wild at the Max Planck Institute for Ornithology in Seewiesen.

3.3 Belang

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

In addition to providing new knowledge on the biology of sleep in brant and barnacle geese, these studies are of general importance because they will provide important comparative data on the principle of sleep homeostasis and the consequences of sleep loss under controlled and (semi)natural conditions. These studies will be important in bridging the gap between ecological studies on sleep in non-rodent species and laboratory studies on the neurobiology of sleep performed in rats and mice. The findings in the proposed species may either, A) confirm findings achieved in rats and mice, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) not confirm findings in rats and mice, thereby shedding new light on certain aspects of sleep regulation and also warning against too easily extrapolating from studies in nocturnal rodents. Additionally, the results from the studies described in this application will provide the crucial baseline data on sleep architecture and sleep homeostasis that will serve as a reference for future studies under challenging conditions in the wild.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

The experiments will be executed by a PhD student specifically appointed for this project under direct supervision of the applicant and his co-workers. The brant and barnacle geese will be maintained in large, semi-natural open areas with ponds available at our institute. For polysomnographic measurements of sleep the geese will be group-housed in smaller aviaries that still allows for exposure to natural light and ambient temperature; yet, also allows for controlled sleep deprivation studies.

For polysomnographic assessment of sleep-wake behavior and sleep architecture (NREM and REM sleep), the geese will undergo surgery to equip them with electrodes for recording brain activity (electroencephalogram, EEG) and muscle activity (electromyogram, EMG). The EEG and EMG signals are stored on a 5g mini-datalogger connected to the electrode-plug on the head of the geese. These loggers can be connected at appropriate times points to start recordings and subsequently disconnected and removed for downloading of the data. Hence, sleep can be recorded repeatedly in the same individual geese across prolonged periods of time to fulfill the two aims described in section 3.2.

For aim one, sleep-wake behavior and sleep architecture will be assessed repeatedly across the year under different photoperiods and different ambient temperatures (spring, summer, autumn, winter). These recordings will include a maximum variation in photoperiod and ambient temperature.

For aim two, animals will be subjected to sleep deprivation of different durations to assess the homeostatic sleep responses, that is, the magnitude and architecture of the rebound sleep during the recovery phase. These experimental sleep deprivations will be done at selective time points, particularly during summer with light-dark conditions of around 12/12 (which is best comparable with studies in other species in the lab) and during summer/autumn when conspecifics in the wild would care for young and migrate (which is relevant with respect to future studies in the wild). Sleep deprivations will be achieved by sounds and, if necessary, by manual stimulation. Sleep deprivations will have a maximum duration of 12h, which is known to induce a clear homeostatic sleep rebound in mammalian species, yet, it still falls within the range of a normal resting period. Since geese are social animals, we will keep them socially housed with at least one other individual during all recordings.

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

The experiments are aimed at determining sleep homeostasis and the effects of environmental conditions on sleep. Recordings to address the two main aims described in section 3.2 can be done in the same geese and can run in parallel. The different practical elements and manipulations are described in more detail in appendix 1 (dierproef 1, bijlage).

Surgery: geese will undergo surgery once, at the beginning of the studies, for implantation of EEG and EMG electrodes according to standard procedures. After surgery, the animals will be allowed at least 2 weeks of recovery before the actual recordings start.

EEG/EMG recordings: data loggers will be connected to the EEG/EMG electrode plug on the head of the geese for recordings that will last up to a maximum of 10 days (battery life of the datalogger). After this, the loggers will be disconnected for downloading and analysis of the data.

Sleep deprivation: during selected recording periods geese will be kept awake for a maximum of 12h at night to assess sleep homeostatic responses. Each individual goose will be subjected to at least 2 but no more than 3 different durations of sleep deprivation to determine a dose-response relationship.

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

The EEG/EMG recordings are aimed at 1) assessing sleep under different light and temperature conditions across the annual cycle; and 2) assessing sleep homeostatic response to sleep deprivation of different durations. The recordings to fulfill these two aims can run in parallel and can be done in the same individuals. The experimental sleep deprivations, however, will be done at selective time points only (summer/autumn). The results of these recordings will provide important phylogenetic comparison since most available information on sleep and sleep homeostasis is now based on studies in mammals under tightly controlled laboratory conditions. Moreover, the results of these recordings provide an important comparison and reference for future studies in wild geese under ecologically challenging conditions.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De ecologie van slaap: nieuwe inzichten op het gebied van slaaphomeostase uit EEG-studies in wilde ganzen
1.2 Looptijd van het project	1-3-2017 tot 1-3-2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	slaap, slaaphomeostase, slaapfunctie, evolutie, ecologie

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>De meeste diersoorten brengen een groot deel van hun leven slapend door. De slaaptoestand lijkt <i>homeostatisch</i> gereguleerd te worden, d.w.z. via een proces dat naar evenwicht streeft. De behoefte aan slaap neemt toe tijdens de wakkere periode en af tijdens slaap.</p> <p>De precieze functie van slaap is een nog onopgelost mysterie. Slaap is een uiterst complexe toestand die bestaat uit twee totaal verschillende en elkaar cyclisch afwisselende vormen, te weten 'non-rapid-eye-movement' (NREM) slaap en 'rapid-eye-movement' (REM) slaap. Elk van deze twee vormen van slaap zou een eigen functie kunnen hebben en op eigen wijze kunnen bijdragen aan, bijvoorbeeld, herstel en plasticiteit van zenuwcellen.</p>
---	--

Het overgrote deel van wat er momenteel over slaap wordt ontdekt en beschreven, is gebaseerd op studies aan nacht-actieve knaagdieren, met name ratten en muizen. Deze bevindingen worden vaak geëxtrapoleerd naar andere soorten, inclusief de mens. Er wordt te weinig gedaan om de algemene geldigheid te toetsen door studies aan andere soorten.

Het doel van dit project is om slaap, slaaphomeostase en de gevolgen van slaapttekort te bestuderen in rotganzen en brandganzen onder semi-natuurlijke omstandigheden. Deze studie zal nieuwe kennis voortbrengen en ook een belangrijke test zijn van heersende ideeën over slaaphomeostase. Ganzen zijn om verschillende redenen interessant, o.a. omdat ze dag-actief zijn, maar vooral omdat ze behoren tot de vogels, een diergroep die tot op heden nog maar in zeer beperkte mate is bestudeerd op slaap.

Er is bij dit project gekozen voor rotganzen en brandganzen omdat deze soorten bij uitstek geschikt en interessant zijn voor de toekomstige studies in de vrije natuur, o.a. omdat ze een jaarcyclus hebben met fases waarin er bijzonder weinig tijd lijkt te zijn voor slaap. Dit zijn met name de voortplantingsfase waarin de ouders een continue zorg voor hun jongen hebben, en de migratiefase waarin de dieren meerdere dagen aaneengesloten in de lucht zijn. Hierbij is de vraag hoe en wanneer de dieren slapen en hoe ze omgaan met het slaapttekort.

In het project zullen in rotganzen en brandganzen onder semi-natuurlijke omstandigheden EEG-metingen gedaan worden met de volgende doelstellingen:

- 1) Het vaststellen van voor de soort specifieke slaap-waak patronen en slaaparchitectuur (verdeling NREM/REM-slaap) onder verschillende omgevingscondities (verschillende licht-donker cycli, verschillende omgevingstemperaturen).
- 2) Het vaststellen van de slaaphomeostatische reacties op het onthouden van slaap (slaapdeprivatie).

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

Nieuwe kennis over de biologie en slaap van de rotgans en brandgans. Toetsing van de algemene geldigheid van resultaten verkregen in ratten en muizen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Rotgans (16)
Brandgans (16)

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

Voor het meten van slaap-waak patronen en slaaparchitectuur worden de dieren onder volledige narcose geopereerd en voorzien van EEG-elektrodes (matig ongerief).

Doelstelling 1: dieren worden blootgesteld aan variërende omgevingscondities (licht-donker cycli en omgevingstemperatuur) binnen de natuurlijk range van deze soorten (licht ongerief).

Doelstelling 2: dieren worden onderworpen aan kortdurende slaapdeprivatie bewerkstelligd door manuele stimulatie en met een maximale duur van

	<p>twalf uur hetgeen binnen de duur van de normale rustfase valt (licht ongerief).</p>
3.5	<p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p> <p>Het maximale ongerief bestaat uit een combinatie van de operatie, na een ruime periode van herstel gevolgd door slaapdeprivatie. Een dergelijke proefopzet zal niet meer dan matig ongerief met zich mee brengen.</p>
3.6	<p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p> <p>Wanneer er geen andere bestemming voor is, worden de dieren na afloop, indien voorzien van EEG-elektroden, geëuthanaseerd.</p>

4 Drie V's

4.1	<p>Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>	<p>De regulatie en functie van slaap kan alleen bestudeerd worden in intacte dieren.</p>
4.2	<p>Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>	<p>Om het aantal proefdieren tot een minimum te beperken, wordt voor de experimenten gebruik gemaakt van een onderzoekopzet waarbij de dieren als eigen controle fungeren (een zogenaamde cross-over onderzoekopzet).</p>
4.3	<p>Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p>	<p>De rotgans en brandgans zijn specifiek gekozen omdat:</p> <p>A) het geen nacht-actieve, maar dag-actieve diersoorten zijn die in dat opzicht meer lijkt op de mens dan ratten en muizen;</p> <p>B) het geen knaagdieren zijn, maar soorten die nadrukkelijk behoren tot een andere diergroep;</p> <p>C) deze soorten ook bij uitstek geschikt en interessant zijn voor toekomstige studies in het wild.</p>
	<p>Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.</p>	<p>De operaties voor het plaatsen van de EEG-elektrodes vinden plaats onder volledige narcose, inclusief noodzakelijke pijnstilling en nazorg. Voor wat betreft de verdere experimentele ingrepen (variatie in omgevingsfactoren en slaapdeprivatie) is er geen reden om een hoge mate van ongerief te verwachten.</p>

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Most of our knowledge on sleep and sleep homeostasis is based on studies in only a few mammalian species under tightly controlled laboratory conditions. Published data suggest that sleep is sensitive to environmental conditions, including light and temperature, but few systematic studies in species other than nocturnal rodents have been performed. In the experiments proposed here we will study how sleep in the brant and barnacle geese is affected by different environmental conditions, particularly different light-dark conditions and different ambient temperatures across the annual cycle. Furthermore, we will assess the homeostatic regulation of sleep by measuring the sleep rebound after sleep deprivations of different durations.

The animals will be equipped with electrodes for recording brain activity (electroencephalogram, EEG) and muscle activity (electromyogram, EMG). Recording of these signals allows for distinguishing between wakefulness, NREM sleep and REM sleep. Based on the EEG/EMG recordings we will be able to assess detailed sleep-wake patterns and sleep architecture (NREM and REM sleep on 10 sec basis). In addition, the EEG signals will be subjected to spectral analysis that provides information about the quality and intensity of sleep. Particularly, EEG power in the 1-4Hz slow-wave range is an established marker of NREM sleep intensity. In mammals, this EEG slow-wave activity increases as a function of the duration of prior wakefulness. In other words, the longer the animal is awake, the higher EEG slow-wave activity during subsequent NREM sleep.

The standard protocol for the study is as follows:

- surgery for implantation of EEG and EMG electrodes
- recovery from surgery
- connecting dataloggers for recording of sleep at different times across the annual cycle (spring, summer, autumn, winter)
- at selected time points, sleep deprivation in semi-random order, each time with sufficient time for recovery in between

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

At the start of the project, the animals will undergo a single surgery for implantation of EEG and EMG electrodes for recording of cortical brain activity and neck muscle activity. Surgeries will be performed under full isoflurane anaesthesia. Holes are drilled into the skull for placement of EEG electrodes on the cortex. The electrode plug is fixed on the skull with dental cement, which is not harmful for the animals, and the wound is closed tightly around it. After surgery, the animals will be allowed at least 2 weeks of recovery before the start of recordings. For experiments, a miniature datalogger (5g) is connected to the electrode plug on the head, which allows for wireless recordings in freely moving animals.

Sleep-wake patterns and sleep architecture will be measured for up to a maximum of 10 days (battery life of the data loggers) under various photoperiod and ambient temperatures in semi-natural conditions across the annual cycle. This will be done repeatedly in the same individual animals across the annual cycle (spring, summer, autumn, winter).

During recording sessions in summer and autumn, the geese will be subjected to sleep deprivation for up to maximum duration of 12h (ranging between 4h and 12h). Each animal will be subjected to sessions of sleep deprivation of different durations (not more than 3), with at least one week in between the sessions to ensure full recovery. Multiple sleep deprivation sessions of different duration are required to establish the 'dose-response' relationship (dose= different durations of sleep deprivation; response = the magnitude of the sleep rebound in terms of both compensatory sleep time and sleep intensity).

Brief sleep deprivation will be achieved by manual stimulation whenever the animals displays signs of sleep. Stimulations primarily involves sounds made by the experimenter or, if necessary, gently approaching and touching the animal when it no longer responds to sounds.

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

Since these will be the first studies on sleep in geese, we have no information on sleep-wake behavior and sleep architecture in this group of birds and also no information on changes in sleep in response to relevant environmental factors and/or sleep deprivation. This information will only become available in the course of this project. We request 16 animals for each species, which should be sufficient to address our main aims based on our experience in other species. This includes an expected loss of 20% due to disturbed EEG/EMG signals and/or loss of implants due to wear and tear in the course of experiments. Furthermore, the number of animals will be minimized by studying the effects of varying environmental conditions and sleep deprivations in a cross-over design and a within-individual comparison. In other words, all animals will be subjected to multiple conditions (aim 1) and sleep deprivations of different durations (aim 2).

B. De dieren

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

The studies will be performed in brant and barnacle geese:

- Barnacle geese (colony of animals already available at our institute); n=16; adult males (n=8) and females (n=8)
- Brant geese (animals bought as young from a commercial provider and then raised at our institute); n=16; adult males (n=8) and females (n=8)

We have selected brant and barnacle geese because they are day-active, non-mammalian species (as opposed to the nocturnal rats and mice, most commonly used in sleep research). Moreover, we have selected these species because they are ideal for later studies in the wild under ecologically challenging conditions (see main project proposal). Barnacle geese are already available at our institute and can be used for this project. Brant geese will be bought as goslings and raised by the PhD student on this project so that the animals will get used to human presence and handling.

Brant and barnacle geese are very interesting species for this project because they are birds, which, from a phylogenetic and evolutionary perspective, is an interesting group in itself. In general, birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Siegel, Trends in Neurosci 2008). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, in particular in relation to song learning (Brawn et al., J Neurosci 2010; Shank and Margoliash, Nature 2009). This suggests that sleep plays an important role in supporting brain function and cognitive processes in birds, very similar to what has been reported for mammals. Yet, at the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a massive reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al., Science 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in mammals that decreased performance is an inescapable outcome of sleep loss and beg for follow-up studies under more controlled conditions. Thus, the ecological demands may have a large impact on how sleep has been evolved between species.

We have specifically selected the brant and barnacle geese for this project to get a broader representation of birds from the goose family, allowing for a more accurate comparison of sleep with other bird groups (songbirds, including ongoing studies in the European staling at our own institute) and the mammalian group. Moreover, the results from the studies in the brant and barnacle goose proposed here provide an important basis of comparison for future studies in the same species. For the brant these future studies will focus on recordings in wild animals under ecologically challenging conditions (reproduction and

migration in Alaska, part of this PhD project). For the barnacle goose these future studies will most likely focus on the role of sleep in cognitive function (new collaboration with other partners and the original owners of the barnacles at our institute). It is therefore important that we assess sleep and sleep homeostasis on both of the goose species. In general, this new research line on sleep in geese will ultimately bridge the gap between ecological and evolutionary studies on sleep in birds and laboratory studies on the neurobiological and molecular underpinnings of sleep mostly performed in rodents.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

The barnacle geese for this project will be retrieved from an existing colony of animals at our institute that has been used for behavioral studies in the past.

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Replacement is not possible. Sleep is a complex neurobiological and behavioral phenomenon that can only be studied in living animals. We have also selected the barnacle and brant geese for specific reasons as described under B.

To keep the number of animals to a minimum, we have chosen for a cross-over design and a within-individual comparison, as opposed to studying independent groups for each environmental condition (aim 1) and for each sleep deprivation sessions (aim 2). We think this is justified because animals are expected to recover from brief sleep deprivation without long-lasting after effects..

Refinement is achieved by using state-of-the art light-weight miniature dataloggers, which allows for recording of EEG/EMG signals in freely moving animals as opposed to a tethered system with recording cables that is still applied in many laboratory sleep studies. Obviously, such tethered recordings would not work in birds under semi-natural conditions.

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

Surgeries are performed under full anesthesia. Other than that, we do not anticipate major pain or suffering. The variation in environmental conditions in our studies are in the range of what these animals would experience under natural conditions and can be expected to adapt to. In addition, the maximum

duration of sleep deprivation is within the range of a normal resting phase and considered mild.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Based on literature search and attendance of major sleep conferences in recent years, we are sure that similar studies are not taking place anywhere else. Also, the world's experts in sleep phylogeny from the Max Planck Institute for Ornithology in Germany are collaborators on this project.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In addition to the surgery for implantation of EEG and EMG electrodes, covered under point H, the animals will undergo multiple sessions (max 3) of brief sleep deprivation by manual stimulation (max 12h).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Sleep deprivation by manual stimulation may cause mild discomfort because we expect that a need and drive for sleep will build up (the animals may become tired).

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

During the recovery week after surgery, health status and wound healing will be inspected daily. The discomfort of sleep deprivation cannot be avoided because it is our main experimental variable in this experiment, but the discomfort is mild because the duration is short and within the range of a normal resting phase (which in rodents still leads to a significant sleep rebound).

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Occasionally, animals will lose the EEG implant, in which case the animal will be removed from the experiment and terminated.

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

The risk of losing an implant increases with longer duration experiments. Eventually this may be up to 20%.

K. Classificatie van ongerief

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

The main discomfort in these experiments stems from the surgery (moderate discomfort). The duration of the sleep deprivation sessions is modest and within the range of a normal resting phase (mild discomfort). Since we allow animals to fully recover before starting the EEG recordings and sleep deprivation sessions, the total discomfort of the experiment as a whole remains moderate.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The geese will be maintained, unless there is no purpose for them in future experiments. In that case, animals with EEG implants will be killed.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **9022**
2. Titel van het project: **The ecology of sleep: new insights in sleep homeostasis from EEG studies on geese in the wild**
3. Titel van de NTS: **De ecologie van slaap: nieuwe inzichten op het gebied van slaaphomeostase uit EEG-studies in wilde ganzen**
4. Type aanvraag:
X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **08-03-2017**
 - aanvraag compleet: **08-03-2017**
 - in vergadering besproken: **16-03-2017**
 - anderszins behandeld: **04-04-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **21-03-2017 tot 30-03-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **30-03-2017**
 - advies aan CCD: **10-04-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **21-03-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:
 - 1/ In de bijlage, onder B. de dieren, noemt u N=16 voor beide soorten: mannetjes en vrouwtjes: de DEC neemt aan n=8 voor beide seksen? Is dat voldoende om mogelijke verschillen op te pakken tussen seksen, zeker in relatie tot latere ecologische vraagstellingen? Is het aantal echt voldoende om mogelijk uitval te dekken?
 - 2/Is er op voorhand informatie bekend over wat verschillen kunnen zijn tussen (semi-)lab en natuurlijke condities (andere diersoorten)?

Vervolgvrage:

1/ Is het de bedoeling dat de dieren in nieuwe EMG/EEG experimenten komen na afloop van de experimenten, of eventueel ook in andere experimenten? Wat gebeurt er dan met de elektroden/dataloggers? Worden deze verwijderd bij hergebruik van de dieren?

- Datum antwoord: **30-03-2017**

- Verstrek(t)e antwoord(en):

- 1/ Het is geen primaire doelstelling om geslachtsverschillen aan te tonen en er zijn ook geen duidelijk argumenten om grote verschillen in slaap tussen de seksen te verwachten bij deze metingen in gevangenschap. Beide seksen kunnen dan ook probleemloos gebruikt worden in dit experiment. Uiteraard zal het geslacht van de dieren uiteindelijk als factor in de analyse van de data worden meegenomen en we gaan daarom uit van N=8 mannetjes en N=8 vrouwtjes voor zowel de Rotgans als Brandgans. Dit is nu in de tekst opgenomen.

De primaire doelstelling voor de metingen in gevangenschap is het meten van de homeostatische respons op slaapdeprivatie en de variatie in slaap en slaaphomeostase over het jaar. Doordat slaap een fundamentele eigenschap is, verwachten we hierin weinig verschillen tussen seksen. Deze studies in het lab, onder (semi-)natuurlijke omstandigheden bieden de basis voor toekomstige ecologische veldstudies en kunnen ook helpen bij de interpretatie wanneer blijkt dat er in het wild wel verschillen tussen seksen optreden. Onder natuurlijk omstandigheden zouden er tussen mannetjes en vrouwtjes wel verschillen kunnen zijn in het slaap-waak ritme, bijvoorbeeld tijdens de broedperiode. Aangezien de dieren in onze eerste studie in gevangenschap niet zullen broeden, verwachten we dit verschil ook niet te observeren.

De steekproef van 16 moet voldoende zijn, zelfs met de ingeschatte uitval. Ons instituut heeft al veel ervaring met het meten van EEG in verschillende diersoorten waarbij dezelfde technieken worden toegepast (muis, rat, toepaja, spreeuw). Ook is één van de medewerkers bij dit project expert in operaties en EEG metingen onder (semi-)natuurlijke omstandigheden. Vanwege de ervaring en de dierfaciliteiten die binnen het instituut aanwezig zijn, verwachten we dat het onderzoek zeer efficiënt kan verlopen waardoor ons gekozen aantal de mogelijke uitval voldoende dekt.

2/De vraag of slaap onder natuurlijke omstandigheden anders zal zijn dan onder (semi-)lab condities is in feite een van de hoofdvragen van deze onderzoekslijn. De verwachting is dat dit inderdaad het geval zal zijn omdat dieren in het wild te maken hebben met allerlei ecologische variabelen en uitdagingen die grote invloed kunnen hebben op slaap maar die in gevangenschap ontbreken (predatie, zorg voor jongen, migratie, etc.). Deze verwachting wordt ondersteund door enkele schaarse slaapstudies die onder natuurlijke omstandigheden zijn uitgevoerd. De allereerste EEG studie in het wild liet zien dat de luiaard, de spreekwoordelijke langslaper, in het wild toch beduidend minder slaapt dan in gevangenschap (Rattenborg et al. Biol Letters 2008). Een ander recente slaapstudie in wilde strandlopers in Alaska toonde aan dat de mannetjes tijdens de piek van de voortplantingsperiode vele dagen nauwelijks slapen omdat ze continue druk zijn met het verdedigen van hun territorium en nest (Lesku et al. Science 2012). Er lijkt dus onder natuurlijke omstandigheden een grote mate van plasticiteit te zijn in slaap die niet voorkomt in het lab waar dieren onder constante omstandigheden worden gehuisvest en voedsel ad libitum aanwezig is. Gecontroleerde studies in gevangenschap en in het lab zijn wel cruciaal om de normale slaap homeostatische responsen te meten in reactie op slaap deprivatie, want die kennis is nodig om eventuele veranderingen daarin onder natuurlijk omstandigheden te begrijpen en te interpreteren.

Antwoord vervolgvraag:

1/Deze vraag was ten dele ook al opgekomen in het voorgesprek met het IvD hoofd. Hierbij kwamen we tot de conclusie dat de ganzen na de studie beschreven in onze CCD aanvraag aangehouden kunnen worden voor latere experimenten, mits de dieren in goede gezondheid zijn en zolang de EEG elektrodes op de kop in goede staat zijn. Het eventuele hergebruik zou kunnen zijn voor nieuwe EMG/EEG experimenten of voor andersoortige studies aan gedrag. Van de elektrodes zullen de ganzen geen ongerief ondervinden want deze zijn klein en zelfs nauwelijks zichtbaar. Verwijderen van de elektrodes is niet mogelijk.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

JA

2. De aanvraag betreft **een nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

JA

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

NEE

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft concrete doelstellingen en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De doelcategorie sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is om onder semi-natuurlijke omstandigheden slaap, slaaphomeostase en de gevolgen van slaapttekort te bestuderen in rotganzen en brandganzen. Er is weinig informatie over slaap bij vogels; verder zijn ganzen dag-actieve vogels. Het uiteindelijke doel is om (1) de verschillen en overeenkomsten met slaap bij zoogdieren, met name nacht-actieve ratten en muizen, waaraan veel onderzoek is gedaan, vast te stellen, en (2) kennis op te doen om later onder ecologisch relevante condities slaap te kunnen meten; immers dieren in het wild, zoals wilde ganzen, hebben periodes waar de hoeveelheid slaap beperkt wordt, zoals tijdens broedzorg en migratie.

Het project betreft fundamenteel onderzoek m.b.t. het directe en het uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel m.b.t. vergelijkend onderzoek zal binnen de looptijd van het project gehaald worden, omdat er in het laboratorium van de aanvrager veel kennis beschikbaar is over slaap, slaaphomeostase en slaapttekort bij nacht-actieve knaagdieren.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project zijn de proefdieren en onderzoekers in het wetenschappelijke veld over slaap.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een beter begrip van slaap, slaaphomeostase en de effecten van slaapttekort.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*

De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **NVT**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de huisvesting en verzorging in het algemeen volgens de richtlijn gebeuren. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).*

Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).* (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van het dier wordt aangetast door het permanent dragen van

EEG/EMG elektroden en dataloggers.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Slaap is niet na te bootsen in vitro.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Bijvoorbeeld, de duur van slaapdeprivatie wordt tot een minimum beperkt en de dataloggers geven de dieren de mogelijkheid zich vrij te bewegen.

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

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I* voor voorbeeld).

In de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke en vrouwelijke dieren in gelijke aantallen gebruikt. Dit is voldoende beargumenteerd door de aanvrager.

Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. Dieren worden alleen gedood als er na afloop geen andere bestemming kan worden gevonden.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

NVT

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project **“Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese”** dat gericht is op fundamenteel onderzoek naar slaap, slaaphomeostase en effecten van slaapttekort het matige ongerief, dat de ganzen wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **er is hier geen specifieke doelgroep; indirect kunnen de betrokken wetenschappers als zodanig beschouwd worden.**

Algemeen: **Er is potentieel groot voordeel vanwege de te verwachten toename van wetenschappelijke kennis met betrekking tot slaap.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de wetenschap binnen het project **"Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese"** zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De betrokken proefdieren blijven (in beginsel) leven na proeven met matig ongerief (zie antwoord onder A9). Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door onder meer het dragen van EEG/EMG elektroden en dataloggers. Hoewel deze in beginsel repercussies kunnen hebben op het natuurlijke gedrag, kunnen de dieren, voor zover duidelijk, vrij bewegen en lijken hier geen hinder van te ondervinden.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project leiden tot een relevante uitbreiding van de wetenschappelijke kennis over slaap.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek vanuit wetenschappelijk oogpunt van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

Daarom beantwoordt de DEC-RUG de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **"Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese"** dat gericht is op fundamenteel onderzoek naar slaap, slaaphomeostase en effecten van slaapttekort het matige ongerief dat de ganzen wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend. Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van onnodige duplicatie. In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RUG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd. Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel **"Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese"** als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171365

Bijlagen

2

Datum 11 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 april 2017. Het gaat om uw project "The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171365. 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:

11 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171365

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171365

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
11 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171365

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: GRONINGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee
Wat mag de gemachtigde doen?
 Een projectvergunning aanvragen
 Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
 Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?
 Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2021
Titel project: The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese
Titel niet-technische samenvatting: De ecologie van slaap: nieuwe inzichten op het gebied van slaaphomeostase van EEG studies in ganzen
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Datum:

11 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171365

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

GRONINGEN



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171365

Bijlagen

2

Datum 11 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 april 2017

Vervaldatum: 11 mei 2017

Factuurnummer: 171365

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171365	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171365

Datum 24 april 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 10 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese" met aanvraagnummer AVD1050020171365. 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 de titel van de NTS en uw aanvraag wordt gesproken over ganzen in het wild. Er wordt echter gebruik gemaakt van dieren die zijn aangekocht als jonge ganzen. Wij zien dit niet als wilde ganzen. Kunt u dit aanpassen in uw aanvraag en NTS?

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. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

24 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171365

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



Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt. Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1050020171365

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

24 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171365

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Vragen van CCD over projectaanvraag AVD1050020171365

Vraag: In de titel van de NTS en uw aanvraag wordt gesproken over ganzen in het wild. Er wordt echter gebruik gemaakt van dieren die zijn aangekocht als jonge ganzen. Wij zien dit niet als wilde ganzen. Kunt u dit aanpassen in uw aanvraag en NTS?

Onze excuses voor deze fout. Deze is voortgekomen uit de plannen om in de toekomst slaapwaak metingen te gaan doen in wilde ganzen. De huidige CCD aanvraag heeft daarop echter geen betrekking. De beschreven studies worden inderdaad uitgevoerd in aangekochte, in gevangenschap ter wereld gekomen jong ganzen. De fout in de titel is hersteld in zowel de projectaanvraag als NTS.



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

All mammals and birds appear to spend a large part of their life asleep. It is widely accepted that sleep is homeostatically regulated and that a need for sleep builds up during wakefulness. Yet, despite many theories, the exact function of sleep remains an enigma (Siegel et al. 2005). Moreover, sleep itself is a complex phenomenon consisting of two distinct stages, non-rapid-eye-movement (NREM) sleep and rapid-eye-movement (REM) sleep. Each of these two stages may have its own function in, e.g., neuronal recovery, maintenance and plasticity (Abel et al. 2013). The apparent importance of sleep is supported by numerous studies showing that sleep deprivation leads to a wide array of molecular, cellular, and physiological changes, behavioral disturbances, and cognitive impairments (Kreutzmann et al. 2015). Also, in humans short or disrupted sleep is associated with an increased risk for various diseases, including metabolic diseases, cardiovascular diseases and psychiatric diseases such as depression [REDACTED]. However, much of what is currently being learned about sleep is based on experimentation in a handful of mammalian species (particularly nocturnal rodents) and almost exclusively in tightly controlled laboratory settings (devoid of any ecological demand that characterizes life in the wild). Indeed, field studies to examine sleep under the natural conditions where it evolved have so far been exceptionally rare. In fact, in most ecological studies that assess behavior in the wild, sleep episodes are often little more than blanks in the activity recordings. However, if sleep indeed serves important functions then the time available for sleep or any restrictions herein may very well be a determining factor in the fitness of an individual.

Although the need for field-based studies of sleep has been recognized for decades, technological limitations largely prevented this ecological approach to investigating sleep. However, recent developments and improvements of this technology have now opened the door for sleep research to go wild. Confirming concerns about the interpretation of some laboratory derived data, initial field studies using these new methods revealed pronounced differences in both timing and amount of sleep between conspecifics in the wild and captivity, suggesting that ecological factors can have a strong influence on sleep (Rattenborg et al. 2008).

Birds are a particularly interesting group of animals for studies on the ecology of sleep. Birds have many features of sleep in common with mammals, including the occurrence of NREM and REM sleep (Beckers et al. 2015). Moreover, various studies in birds have shown sleep-dependent learning and memory processes, which suggests that sleep supports brain function in birds in a way that is similar to what has been reported for mammals (Beckers et al. 2015). At the same time, studies of sleep in birds may also lead to surprising findings and novel insights. For example, it was recently shown that pectoral sandpipers are able to maintain high behavioural performance despite a strong reduction in sleep time during a 3-week period of intense male-male competition for access to fertile females (Lesku et al. 2012). Moreover, males that slept the least ultimately produced the most offspring. These findings challenge the common view emerging from studies in laboratory rodents that decreased performance and health is an inescapable outcome of sleep loss. However, too few studies like these have been done to draw any firm conclusions. Is there a high tolerance to the consequences of sleep loss in some species during certain phases of the life cycle when time for sleep is limited? Is there a high degree of adaptive plasticity in sleep under natural conditions that is not seen in laboratory rodents?

Long-distance migration is another common phenomenon in birds that is thought to occur at the expense of sleep. Some migrating birds are in flight for many days without pausing to rest and recover. It has been suggested that long-distance migrators may sleep during flight, perhaps unihemispherically as is known from dolphins (Rattenborg et al. 2006) and was recently shown in frigate birds doing multi-day foraging flights over the ocean (Rattenborg et al. 2016). In these cases, one half of the brain occasionally sleeps, while the other half remains awake, perhaps to coordinate movements and orientation. Even so, such unihemispheric sleep may not be as efficient as bihemispheric sleep and the total amount of sleep frigate birds had during flight was minimal. Moreover, the frigate birds gained most of their limited sleep during soaring and gliding flights, a capacity that many other birds do not have. Therefore, these data cry for new studies in other species to answer the question whether birds truly sleep during migration, whether they sleep enough, and how much recovery sleep they need at the end of the migratory flight. Do migrating birds accrue a serious deficit of one sleep stage or another, or do unknown physiological adaptations allow them to temporarily go without sleep?

We here propose to study sleep in brant geese (*Branta bernicla*) and barnacle geese (*Branta leucopsis*), which for several reasons are extremely interesting and suitable for studies on sleep under natural conditions. Most importantly, these geese display huge variation in the timing and amount of activity across the annual cycle, and during some phases the time for sleep appears to be limited. The reproductive phase is particularly interesting in that respect. During that time, the brant geese at our intended study sites in northern Alaska live under the continuous light of the Arctic summer. Barnacle geese migrate to the north of Greenland/Nova Zembla where they live under continuous light as well. The parents of both geese species are continuously busy guarding their nests and their self-foraging young under high risk of predation by, a.o., foxes (Raveling 1989). Another phase of the annual cycle that is of particular interest is the period of migration. However, the timing and duration of migration between the two species are different. The differences in environmental factors could alter sleep homeostasis and architecture for both species. This makes the brant and barnacle appropriate candidates to address the aim of assessing the sleep-wake behaviour, sleep architecture and sleep homeostasis and comparison between these species, with the added advantage that these geese are large enough for mounting of miniature devices without affecting their natural behaviour.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

In the studies described in this application we will assess sleep, sleep homeostasis and consequences of sleep deprivation in brant and barnacle geese under semi-natural conditions in our facility at the University of Groningen. In the available aviaries the geese can be exposed to natural light and temperature for measurements of spontaneous variation in sleep architecture across the seasons; yet, at the same time these aviaries allow for controlled and detailed assessment of homeostatic sleep responses to experimental sleep deprivation of different durations. These studies are important to, A) confirm findings on sleep homeostasis achieved in mammals, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) shed new light on aspects of sleep regulation and sleep homeostasis that may be specific for certain species. Importantly, the findings of species-specific aspects of sleep would fuel the concern that caution is required with extrapolation of results from studies in nocturnal rodents to other species (including humans). Moreover, the studies described in this application also form the necessary prelude to future studies in the wild, which will aim to assess sleep during the reproductive season and during migration when the time for sleep appears to be limited. To be able to interpret such future data on sleep (or a lack of sleep) measured in the field under challenging conditions, we will now first make a detailed assessment of sleep architecture and sleep homeostasis under semi-controlled conditions.

The main aims of the current project are:

1) Assessment of sleep-wake behavior and sleep architecture in brant and barnacle geese by means of polysomnography under semi-natural conditions across the annual cycle (different light conditions, different ambient temperatures). Published data suggest that sleep is sensitive to environmental conditions, including light and temperature, but few systematic studies in species other than nocturnal rodents have been performed and only one study in birds is ongoing at our institute (the European starling).

2) Assessment of the homeostatic sleep response to experimental sleep deprivation of different durations (i.e., the occurrence of a NREM and REM sleep rebounds). It is well established that humans, rats, and mice display a homeostatic response to sleep deprivation, that is, they catch up for lost sleep by showing a rebound sleep. This rebound is particularly clear for NREM sleep but less convincing (and perhaps species-dependent) for REM sleep. However, a careful and quantitative assessment of sleep homeostatic responses has been performed in few species other than the usual mammalian suspects.

Feasibility of the project:

We foresee no problems with the execution of this project. The Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences at the University of Groningen has outstanding facilities for the studies described in this application, including large semi-natural outdoor areas with ponds and a large number of different sized aviaries ideally suited for controlled, experimental studies. Different species of geese have been successfully maintained at our institute for many years. Also, the required equipment for EEG recording and EEG analysis are available at our institute and the applicant has ample experience with these kind of studies in different species. The experiments are integrated in one PhD project. Moreover, the studies are part of an ongoing collaboration with experts in bird migration and ecology within our own institute and with the worlds' leading experts on the phylogeny of sleep and sleep studies in the wild at the Max Planck Institute for Ornithology in Seewiesen.

3.3 Belang

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

In addition to providing new knowledge on the biology of sleep in brant and barnacle geese, these studies are of general importance because they will provide important comparative data on the principle of sleep homeostasis and the consequences of sleep loss under controlled and (semi)natural conditions. These studies will be important in bridging the gap between ecological studies on sleep in non-rodent species and laboratory studies on the neurobiology of sleep performed in rats and mice. The findings in the proposed species may either, A) confirm findings achieved in rats and mice, thereby providing important supports for the generalizability of these findings; or B) not confirm findings in rats and mice, thereby shedding new light on certain aspects of sleep regulation and also warning against too easily extrapolating from studies in nocturnal rodents. Additionally, the results from the studies described in this application will provide the crucial baseline data on sleep architecture and sleep homeostasis that will serve as a reference for future studies under challenging conditions in the wild.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

The experiments will be executed by a PhD student specifically appointed for this project under direct supervision of the applicant and his co-workers. The brant and barnacle geese will be maintained in large, semi-natural open areas with ponds available at our institute. For polysomnographic measurements of sleep the geese will be group-housed in smaller aviaries that still allows for exposure to natural light and ambient temperature; yet, also allows for controlled sleep deprivation studies.

For polysomnographic assessment of sleep-wake behavior and sleep architecture (NREM and REM sleep), the geese will undergo surgery to equip them with electrodes for recording brain activity (electroencephalogram, EEG) and muscle activity (electromyogram, EMG). The EEG and EMG signals are stored on a 5g mini-datalogger connected to the electrode-plug on the head of the geese. These loggers can be connected at appropriate times points to start recordings and subsequently disconnected and removed for downloading of the data. Hence, sleep can be recorded repeatedly in the same individual geese across prolonged periods of time to fulfill the two aims described in section 3.2.

For aim one, sleep-wake behavior and sleep architecture will be assessed repeatedly across the year under different photoperiods and different ambient temperatures (spring, summer, autumn, winter). These recordings will include a maximum variation in photoperiod and ambient temperature.

For aim two, animals will be subjected to sleep deprivation of different durations to assess the homeostatic sleep responses, that is, the magnitude and architecture of the rebound sleep during the recovery phase. These experimental sleep deprivations will be done at selective time points, particularly during summer with light-dark conditions of around 12/12 (which is best comparable with studies in other species in the lab) and during summer/autumn when conspecifics in the wild would care for young and migrate (which is relevant with respect to future studies in the wild). Sleep deprivations will be achieved by sounds and, if necessary, by manual stimulation. Sleep deprivations will have a maximum duration of 12h, which is known to induce a clear homeostatic sleep rebound in mammalian species, yet, it still falls within the range of a normal resting period. Since geese are social animals, we will keep them socially housed with at least one other individual during all recordings.

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

The experiments are aimed at determining sleep homeostasis and the effects of environmental conditions on sleep. Recordings to address the two main aims described in section 3.2 can be done in the same geese and can run in parallel. The different practical elements and manipulations are described in more detail in appendix 1 (dierproef 1, bijlage).

Surgery: geese will undergo surgery once, at the beginning of the studies, for implantation of EEG and EMG electrodes according to standard procedures. After surgery, the animals will be allowed at least 2 weeks of recovery before the actual recordings start.

EEG/EMG recordings: data loggers will be connected to the EEG/EMG electrode plug on the head of the geese for recordings that will last up to a maximum of 10 days (battery life of the datalogger). After this, the loggers will be disconnected for downloading and analysis of the data.

Sleep deprivation: during selected recording periods geese will be kept awake for a maximum of 12h at night to assess sleep homeostatic responses. Each individual goose will be subjected to at least 2 but no more than 3 different durations of sleep deprivation to determine a dose-response relationship.

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

The EEG/EMG recordings are aimed at 1) assessing sleep under different light and temperature conditions across the annual cycle; and 2) assessing sleep homeostatic response to sleep deprivation of different durations. The recordings to fulfill these two aims can run in parallel and can be done in the same individuals. The experimental sleep deprivations, however, will be done at selective time points only (summer/autumn). The results of these recordings will provide important phylogenetic comparison since most available information on sleep and sleep homeostasis is now based on studies in mammals under tightly controlled laboratory conditions. Moreover, the results of these recordings provide an important comparison and reference for future studies in wild geese under ecologically challenging conditions.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

9713 AV GRONINGEN



**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

AVD1050020171365

Bijlagen

1

Datum 26 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 10 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese" met aanvraagnummer AVD1050020171365. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 25 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. De titel van het projectvoorstel en de NTS zijn in overeenstemming gebracht met de inhoud van het project.

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.

U kunt met uw project "The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2017 tot en met 1 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

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

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
26 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171365

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:



Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2017 tot en met 1 maart 2021, voor het project "The ecology of sleep: new insights on sleep homeostasis from EEG studies on geese" met aanvraagnummer AVD1050020171365, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 april 2017, ontvangen op 10 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 25 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Assessment of sleep-wake patterns, sleep architecture and sleep homeostasis in brant and barnacle geese				
	Andere vogels (andere Aves) / rotgans en brandgans	32	100% Matig	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer:
AVD1050020171365

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD1050020171365

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:
AVD1050020171365

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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