

Inventaris Wob-verzoek W21-04										
nr.	document NTS20171046	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier, d.d. 2 juni 2017				x		x		x	
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x				x	
4	Bijlage bij projectvoorstel - Overzicht van dierproeven die onder het project worden gebracht			x						
5	Bijlage bij projectvoorstel - Flow charts				x				x	
6	Bijlage bij projectvoorstel - overzicht van studies en kennis over het onderzoeksonderwerp			x						
7	Bijlage dierproeven 1				x				x	
8	Bijlage dierproeven 2				x				x	
9	DEC-advies, d.d. 2 juni 2017				x		x		x	
10	Ontvangstbevestiging, d.d. 2 juni 2017				x		x		x	
11	Aanvraagformulier, per post verzonden versie, d.d. 7 juni 2017				x		x		x	
12	Interne adviesnota CCD, d.d. 21 juni 2017				x		x		x	
13	E-mail van vergunninghouder aan CCD - vraag naar voortgang behandeling aanvraag, d.d. 5 juli 2017				x		x		x	
14	E-mail van CCD aan vergunninghouder - reactie op vraag naar voortgang behandeling aanvraag, d.d. 5 juli 2017				x		x		x	
15	E-mail van CCD aan vergunninghouder - Verzoek om aanvulling van de aanvraag, d.d. 10 juli 2017				x		x		x	

16	E-mail van vergunninghouder aan CCD - begeleidend bericht bij reactie op verzoek om aanvulling van de aanvraag, d.d. 7 augustus 2017				x		x		x	
17	Reactie op verzoek om aanvulling van de aanvraag, d.d. 7 augustus 2017				x		x		x	
18	Aanvullende interne adviesnota CCD, d.d. 18 augustus 2017				x		x			
19	Beschikking en vergunning, d.d. 31 augustus 2017				x		x		x	
20	E-mail van CCD aan DEC - terugkoppeling over advisering, d.d. 30 oktober 2017				x		x		x	



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

- Ja > Vul uw deelnemernummer in
- Nee > U kunt geen aanvraag doen

10.2.g

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie  
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde  
KvK-nummer  
Straat en huisnummer  
Postbus  
Postcode en plaats  
IBAN

10.2.g  
10.2.e en 10.2.g

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Tenaamstelling van het rekeningnummer

10.2.g

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters  
Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
E-mailadres

10.2.e en 10.2.g  
10.2.e en 10.2.g  
10.2.e en 10.2.g

Dhr.  Mw.

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters  
Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
E-mailadres

10.2.e en 10.2.g  
10.2.e en 10.2.g

Dhr.  Mw.

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 07 - 2017
- Einddatum 01 - 07 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Visuele waarneming door directe stimulatie van de hersenschors met als uiteindelijk doel herstel van het gezichtsvermogen voor blinden.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres
- 10.2.g

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege  
 Wijziging € Lege
- 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
- Appendices 2 stuks; bijlage DEC protocollen; bijlage Approaches to treating blindness

## 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 10.2.e en 10.2.g  
 Functie  
 Plaats 10.2.g  
 Datum 01 - 06 - 2017  
 Handtekening 10.2.e en 10.2.g



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Visuele waarneming door directe stimulatie van de hersenschors met als uiteindelijk doel herstel van het gezichtsvermogen voor blinden
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | perceptie, visuele prothese, blindheid, hersenschors, visuele waarneming

### 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
- 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)
- Circa veertig miljoen mensen in de wereld zijn blind. Het verlies van het gezichtsvermogen vermindert hun autonomie en de kwaliteit van hun leven. In dit project willen we kennis ontwikkelen die het op termijn mogelijk zal maken een prothese te ontwikkelen. Deze prothese stimuleert het voor zicht verantwoordelijke deel van de hersenen ('visuele hersenschors') met behulp van micro-elektrodes. De elektrodes zijn verbonden met een camera. Een visuele hersenschorsprothese zou uitkomst kunnen bieden voor een grote groep patiënten want de meerderheid van de blinde patiënten heeft geen baat bij een netvliesprothese (chip in het netvlies) omdat bij hen de verbinding tussen het oog en de hersenen verloren is gegaan.
- In de eerste plaats willen we onderzoeken hoe we waarneming kunnen

bewerkstelligen door het stimuleren van zenuwcellen in de visuele hersenschors. Daarnaast willen we inzicht krijgen in de wijze waarop de prothesebeelden worden verwerkt in andere hersengebieden om deze verwerking te kunnen vergelijken met de verwerking van normale visuele beelden. Dat stelt ons in staat de werking van latere generaties van de prothese te verbeteren. In dit project willen we de technologie ontwikkelen om camerabeelden te kunnen 'schrijven' op de visuele hersenschors. Onze inzichten in de hersenprocessen die ten grondslag liggen aan visuele waarneming zijn hierbij van essentieel belang.

Hoewel het idee om een visuele hersenschorsprothese te maken een lange geschiedenis heeft, is er in de laatste 15 jaar relatief weinig vooruitgang geboekt, mede omdat onderzoekers prothesen bij patiënten implanteerden voordat voldoende inzicht was verkregen in hun effectiviteit. Dit staat in contrast met de ontwikkelingen op het gebied van hersenschorsprothesen voor patiënten met verlammingen. In deze patiëntengroep zijn de eerste experimentele implantaten al zeer succesvol in de testfase; ze stellen verlamde patiënten in staat om bijvoorbeeld een robotarm te besturen, een ontwikkeling die mogelijk werd door zorgvuldig voorafgaand proefdieronderzoek.

Ons team ontwikkelt methoden om een visuele hersenschorsprothese in de mens mogelijk te maken. De prothese bestaat uit een groot aantal minuscule elektroden die chirurgisch worden aangebracht in de visuele hersenschors. De methode willen we eerst zorgvuldig uittesten in resusapen. We willen de verwerking van een elektrisch stimulatiepatroon in de visuele hersenschors vergelijken met de verwerking van beelden die via de ogen binnenkomen. Hoe communiceren hersencellen in verschillende gebieden van de hersenschors met elkaar tijdens de prothesebeelden? Is dat vergelijkbaar met de normale visuele waarneming? Hoe wordt een elektrisch geïnduceerde stimulus verwerkt door de hersenschors?

We verwachten in de komende 5 jaar voldoende inzichten te kunnen verschaffen in de efficiëntie van de visuele hersenschorsprothese zodat de eerste tests met de prothesen in blinde mensen kunnen worden opgestart. We hopen met dit project binnen afzienbare tijd nieuw perspectief te bieden voor blinde patiënten.

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

In het project worden wetenschappelijke gegevens verzameld die bijdragen aan de ontwikkeling van de prothese: 1) de verwerking van elektrisch geïnduceerde hersenactiviteit, 2) de wijze waarop zenuwcellen in verschillende visuele gebieden samenwerken tijdens de interpretatie van het prothesebeeld en tijdens normale waarneming, 3) de wijze waarop het prothesebeeld of een visueel beeld wordt omgezet in een doelgerichte (oog)beweging, 4) de vraag of het mogelijk is de aandacht te richten op sommige aspecten van het prothesebeeld en, zo ja, hoe zich dat verhoudt tot aandachtsverschuivingen binnen een visueel beeld en 5) de mate van complexiteit van patronen van hersenstimulatie die kunnen worden waargenomen als een visueel beeld.

We weten dat elektrische stimulatie van een enkele elektrode in de visuele hersenschors leidt tot de waarneming van een enkel lichtpunt. Ons doel is kennis te vergaren over de verwerking van visuele stimuli door de hersenen om een hersenschorsprothese voor complexere waarnemingen te kunnen ontwikkelen. Op welke wijze kunnen we informatie van een camera het best overdragen op de hersenen van blinde patiënten?

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen

Voor deze experimenten gebruiken wij in vijf jaar tijd maximaal 14 resusapen.

zullen worden gebruikt?

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

Negatieve gevolgen voor het welzijn van proefdieren zijn 1) pijn als gevolg van operaties. Daarom worden de operaties verricht onder volledige anesthesie en wordt gezorgd voor adequate pijnbestrijding, 2) gewenning aan het uitvoeren van de taken. Dat gebeurt stap voor stap om stress te vermijden.

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

Voor de resusapen zal het ongerief matig zijn, omdat voor de proeven operaties onder anesthesie nodig zijn. Dit niveau van matig ongerief is van korte duur. De rest van de tijd dat een aap in de proef zit, is het ongerief licht.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De maximaal zeven dieren met testversies van de protheses zullen na afloop van de proef worden gedood omdat we inzicht moeten krijgen in de mogelijke schadelijke effecten van de prothese op het hersenweefsel. Het hersenweefsel wordt onderzocht onder de microscoop. De andere, maximaal zeven dieren, worden alleen gedood als er een wetenschappelijke noodzaak bestaat de posities van de implantaten nauwkeurig te bepalen. Indien die noodzaak er niet is worden de mogelijkheden overwogen om het dier blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of wordt overwogen het dier te herplaatsen (zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>).

## 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.

Om in detail de interacties tussen verschillende hersengebieden bloot te leggen, is het belangrijk gedrag te bestuderen en tezelfdertijd hersenactiviteit te meten en te beïnvloeden. Het gebruik van celculturen, of van diersoorten lager dan zoogdieren, zal niet leiden tot het bereiken van onze doelstelling. Knaagdieren zijn ook niet geschikt omdat hun visuele hersenschors te klein is om de prothese uit te proberen. Bovendien kunnen zij niet getraind worden in de visuele taken die nodig zijn in dit onderzoek. Daar waar mogelijk maken we gebruik van niet-invasieve methoden zoals MRI, EEG en psychofysica in mensen, maar deze metingen stellen ons niet in staat om een hersenschorsprothese voor blinden te ontwikkelen omdat ze ons niet in staat stellen om hersencellen met voldoende resolutie te stimuleren. Vervanging van deze dierproeven is niet mogelijk. Eerdere pogingen om een dergelijke prothese rechtstreeks op patiënten uit te testen hebben geleid tot complicaties voor de patiënten zonder dat zij profijt hadden van de prothese (zie bv "Search for Paradise" door Jens Naumann).

### 4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

In elk van de projecten willen we resultaten bij twee dieren verkrijgen. Soms is het nodig een derde dier te testen, indien een resusaap een bepaalde taak niet kan leren of indien er verschillen bestaan tussen de resultaten bij de eerste twee dieren. Het is onze ervaring dat we betrouwbare resultaten verkrijgen met twee of maximaal drie apen per experiment. Verdere vermindering vindt plaats omdat dezelfde dieren kunnen worden gebruikt in meerdere experimenten. Zo'n nieuw experiment bestaat veelal uit het trainen van een dier voor een andere taak.

### 4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de

Alle procedures (inclusief de huisvesting van de resusapen) zijn erop gericht het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend

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

over de visuele hersenschors van de resusaap en dit proefdier is het enige met een visueel systeem dat voldoende lijkt op dat van de mens om een visuele hersenschorsprothese te kunnen ontwikkelen.

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

- 1) We beperken we de hoeveelheid stress tot een minimum door de apen geleidelijk te laten wennen aan alle aspecten van de gedragstaken. Dit is ook van belang voor het welslagen van de experimenten, daar gestreste dieren niet of nauwelijks zullen participeren.
- 2) De dieren worden getraind in een regime met gecontroleerde vloeistofopname. Zij krijgen de voor hun gezondheid benodigde hoeveelheid vocht tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van deze werkwijze te voorkomen. In onze ervaring leidt dat tot gering ongerief en zijn er geen negatieve gevolgen voor de gezondheid.
- 3) Alle operaties worden uitgevoerd onder anesthesie door personen die goed zijn opgeleid en een ruime ervaring hebben. Na de operaties worden pijnstillers gebruikt om postoperatieve pijn te voorkomen.
- 4) De implantaten (waaronder de prothese zelf) zijn speciaal ontworpen op basis van de anatomie (CT-scan en MRI scan) van individuele dieren.
- 5) De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest, in tweetallen in een verrijkte omgeving, om zo het ongerief van het leven in een kooi te beperken en om de cognitieve vermogens in conditie te houden.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 Provide the title of the project.

Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind

### 2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- 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.

The aim of this project is to develop a visual cortical prosthesis in macaque monkeys with the ultimate aim of restoring a limited form of vision to blind human patients and to gain knowledge about the neural mechanisms of visual perception that can be applied to improve the design of the prosthesis.

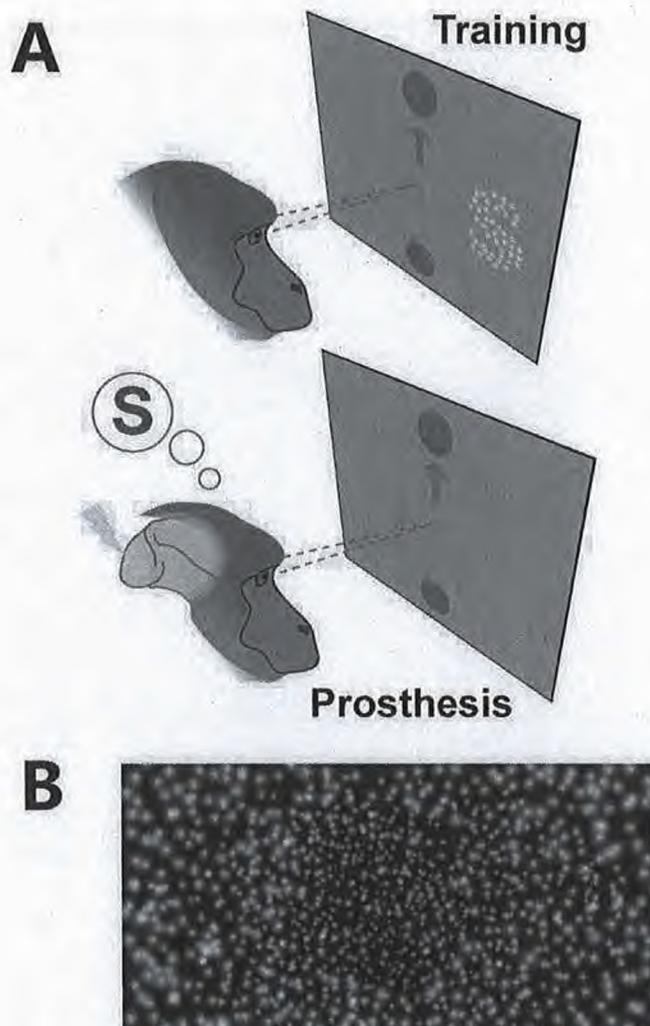
Humans, and other primates, rely on vision as their dominant sense and loss of vision can have devastating consequences. Currently there is no satisfactory treatment to restore vision to patients who have become blind or have severely impaired vision due to damage to the eyes. It has long been known that electrically stimulating a microelectrode situated in visual cortex with microampere currents ('microstimulation') can produce perception of small spots of light known as 'phosphenes', a phenomenon we have studied in our previous work (e.g. Dagnino et al., 2015). Visual cortex contains several maps of the outside world, and the perceived location and size of the phosphene depends upon the location of the stimulating electrode within these maps as well as the position of the eyes. Our aim is to recreate a basic form of visual perception by implanting multiple micro-electrodes (arranged in an array) into visual cortex and stimulating several electrodes simultaneously to produce patterns of phosphenes (Figure 1). Although the idea to create a visual prosthesis to restore visual perception to blind patients using microstimulation has a long history (Brindley and Lewin, 1968; Döbelle et al., 1974), little progress has been made in the last 15 years in spite of the fact that technical progress to create brain-computer interfaces has been spectacular. One of the reasons for the lack of progress is that researchers implanted blind patients without having done sufficient ground work in experimental animals (Naumann, 2012). This led to the use of implants consisting of surface electrodes, which require high currents to produce phosphenes and have insufficient spatial resolution to produce useful percepts. Furthermore, these electrodes were coupled to relatively crude and large connectors which had a high risk of causing infections. This is very different from the field of motor prostheses where sufficient animal work has been done and now the first successful experimental implants for humans have been achieved.

There are several approaches to treating blindness that are currently being followed by labs around the world. We have included a table in the appendix listing these various approaches and their relative advantages and disadvantages. Direct microstimulation of the brain has the advantage that it can be used in patients with severely damaged retinas in which retinal therapies will not work, these include previously sighted patients who have sustained damage to both eyes through injury or patients suffering from diseases such as retinitis pigmentosa, advanced macular degeneration and glaucoma. Furthermore, microstimulation is well-studied technique that has proven to be safe for extended periods of time. A recent report by Chen et al. 2014, carried out chronic stimulation of the primary somatosensory cortex of three rhesus macaque monkeys, with the specific aim of examining the safety and efficacy of the microstimulation approach over a prolonged period of implantation. Stimulation was delivered through chronically implanted electrodes for 4 hours per day, over a period of six months. They concluded that electrical stimulation had minimal long-term effects on the tissue, and these results supported the development of such technology.

To create useful visual percepts that can guide behavior in humans it would be necessary to implant several hundred or more electrodes in visual cortex. A prosthesis with too few electrodes would be doomed to failure as the artificially induced percept would not have sufficient resolution to guide behavior. Electrode arrays of this size have never been used before and we still understand little about the relationship between microstimulation of multiple electrodes simultaneously and the perception of phosphenes. This project will pilot the development of large microelectrode arrays and test the practical implications of implanting these arrays into visual cortex of macaque monkeys with the ultimate aim to create a visual prosthesis for blind people. We have recently received a highly competitive grant from NWO-STW called NESTOR to develop such a visual cortical prosthesis (<http://www.stw.nl/nl/content/zes-nieuwe-perspectief-programmas-van-start>). This grant has a duration of five years and will begin in June 2017.

At first sight the idea behind the visual prosthesis is simple. A camera records an image of the visual scene, which is translated into micro-ampere currents in electrodes chronically implanted in visual cortex (Figure 1A). For our initial tests in macaque monkeys it is unnecessary to use a camera as we will control the visual stimulation ourselves. Micro-stimulation of each individual electrode induces the perception of a phosphene at a particular location in the visual scene. Stimulation of multiple electrodes would produce

the perception of multiple phosphenes, with a number and density determined by the number and spacing of the electrodes (Figure 1B). The perception of a shape could then be produced by stimulating only a subset of the electrodes. The first iteration of the prosthesis has already been designed. As part of our current research program (DEC protocol #3 in the attached file 'Overview of DEC protocols currently in progress') we are training monkeys to discriminate between shapes composed of small spots of light. We aim to implant these monkeys with the first iteration of the prosthesis and then test whether the monkeys can perform the same task on shapes constructed entirely from phosphenes generated by micro-stimulation. This would be an important first step to demonstrate the feasibility of the visual prosthesis.



**Figure 1. A visual prosthesis.** A) We plan to develop a visual prosthesis in macaque monkeys. (Upper panel) For the first iteration, monkeys will be trained to associate visually presented letters with an eye movement (indicated by the blue arrow e.g. upwards for the letter 'S'). Letters will be composed of small spots of light to simulate phosphenes. After implantation of the prosthesis the letters will be presented by directly micro-stimulating the primary visual cortex to produce phosphene percepts. The monkey reports his percept via an eye-movement (indicated by the blue arrow). Using this technique, we can probe the complexity of the monkey's percept. B) The number and location of all possible phosphenes depends entirely on the number and density of electrodes implanted in the brain. To produce a useful prosthesis, it is necessary to implant several hundred (most likely >1000) electrodes.

While important, this first iteration of the prosthesis is likely to produce only a relatively crude visual percept. This is because vision does not work like a camera, faithfully reproducing the image on the

retina. Instead, vision is an active process in which the input from the retina is combined with top-down expectations, visual context, previous visual experience and current behavioral relevance to produce a well-structured percept that is organized into recognizable objects (Fig. 2A).

The lowest cortical area is V1, which receives the information from the eye once it has been relayed by the thalamus. V1 neurons process visual information from a small region of the retina (their 'receptive field', RF) and they represent simple visual properties, such as the location and orientation of a contour. Information from V1 is fed forward to cells in higher visual areas, which respond to visual stimulation of a much larger region of the retina and have more complex tuning properties. For example, some cells in higher visual areas encode the shape of a particular object or face in the visual scene, the color of the object or its direction of motion.

If we ignore the rules that the brain uses to represent complex objects and the mechanisms that are in place to separate objects from each other and from their backgrounds, then we run the risk of producing confusing patterns of phosphenes that cannot be interpreted easily by the patient (Fig. 2B). To produce a more advanced, second iteration, of the prosthesis we need to gather knowledge about how the brain represents more complex aspects of the visual world and how it groups together the separate parts of objects into a coherent whole.

Information does not only travel in a feedforward direction from lower to higher cortical areas, but information is also propagated in the feedback direction, from higher visual areas back to lower visual areas. Previous work has shown that this feedback is important for grouping together the individual parts of objects [10.2.e en 10.2.g](#). For example, when a monkey sees the visual stimulus shown in Figure 2D, a wave of synaptic input from the retina arrives in V1 at about 40-50ms after stimulus onset. This triggers a burst of strong neural firing in V1 whose strength depends only on the visual information present in the RF. The information is rapidly propagated to the higher levels of the visual hierarchy. Following this 'feedforward sweep' of activity, cells in higher visual areas begin to send feedback back to V1. After approximately 100ms, V1 receives feedback from higher visual areas and subcortical structures, which enhance the activity on objects ('figures', blue in Fig. 2D) and suppress the activity on backgrounds (purple in Fig 2D). A more advanced version of the prosthesis could also target cells in higher visual areas to directly produce more complex percepts. This concept is shown in Figure 2B. We first pre-process the visual scene to extract the boundaries of objects and reduce background clutter (Fig. 2B, upper-right panel). Nevertheless, the resulting pattern of phosphenes is still confusing and it is difficult to recognize the objects (Fig 2B, lower-left panel). By micro-stimulating cells in higher areas that encode specific objects and that send feedback back to V1, we could take advantage of the brain's natural ability to group together the separate parts of an object into a whole. The phosphenes that belong to one relevant object are expected to become more clearly visible as part of the same object, thus producing a clearer percept (Fig. 2B, lower-right panel).

We still do not yet fully understand how this process occurs in natural vision. To gain knowledge on this topic we will make simultaneous recordings of neural activity from cells in different areas of the monkey brain that encode for visual objects. By studying how these cells are connected with one another, and how their activity depends on active vision we will uncover the mechanisms by which neurons correctly group the visual scene into coherent, well-organized objects. We will use microstimulation to investigate the influence of higher on lower brain areas as well as the influence of lower on higher brain areas during

active vision. This information will be used to target particular neural structures and optimize the electrical stimulation patterns in later iterations of the prosthesis.

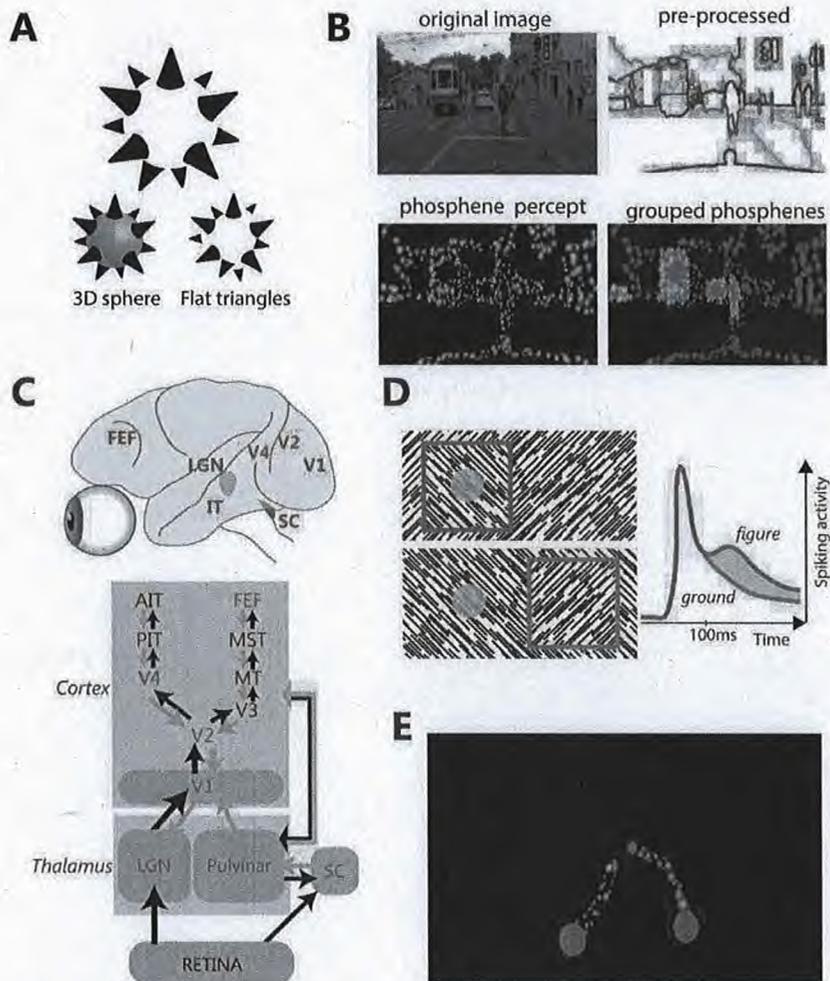


Figure 2. A) Visual perception does not simply reflect the pattern of light hitting the retina. Perception is organized into well-grouped objects. Here a pattern of black triangles is perceived as a 3D sphere and illusory contours can be perceived along the edges of the sphere. Slight misalignment of the triangles destroys the organization. B) A typical visual scene (upper-left panel) can be pre-processed using edge-detection algorithms (upper-right panel) to reduce clutter, however the resulting phosphene percept is still confusing (lower-left panel). Adding a grouping signal to indicate which phosphenes belong to the same object would greatly assist the patient in interpreting the scene (lower right-panel). C) The macaque brain with a few areas of interest marked (cortical areas in red, subcortical in green), the panel to the right shows a simplified model of the visual hierarchy. Black arrows show feedforward connections (e.g. from retina to thalamus) and blue arrows show feedback projections. Not all connections are shown. LGN = lateral geniculate nucleus of the thalamus, SC = superior colliculus. D) Enhanced neural activity is spread through objects to segregate them from their background. Cells in V1 only receive visual information from the retina in the region defined by the small green circle (their receptive field, RF). In the upper panel the RF is situated on a figure, in the lower panel it is situated on the background, but the contents of the RF are identical in both cases. The right panel shows the typical neural response in V1. The initial response does not discriminate between figure and ground. After 100ms, at the time the cells receive feedback from higher visual areas, the neural response is enhanced on figures and suppressed on backgrounds. E) In natural vision, attention is used to select objects for behavioral responses. The curve-tracing task tests how attention spreads through the parts of objects, grouping them together. In this phosphene-based version, the monkey has to fixate the central red dot (the fixation point) and make an eye-movement to the larger red circle that is connected to the fixation point by a set of connected phosphenes. Hence, the animal must direct attention to the right phosphene-based curve and ignore another phosphene-based curve (the one on the left).

We direct our attention to those objects in the visual scene that matter for our behavioral goals and withdraw attention from the other, less relevant objects. We need to understand whether these shifts of attention are also possible for the artificial percepts that are elicited by the stimulation of the visual cortex. It is possible to attend some phosphenes and suppress the representation of irrelevant ones? To shed light on this important question, we will test the ability of monkeys to direct their attention to visual objects that are defined by microstimulation (Figure 2E). We will then investigate if the attended phosphenes are represented differently than the non-attended phosphenes in downstream structures, including higher cortical areas and the superior colliculus (SC), which is important for the generation of eye movements. We expect that attended phosphenes exert a stronger influence on these higher cortical areas and subcortical structures than unattended ones.

Later iterations of the prosthesis should also take advantage of the fact that cortex is a six-layered structure. Particular anatomical connections have well-defined origins and targets in the different layers. For example, the feedback connection from higher areas (such as V2) to V1 targets layer 1 and layer 5 of the cortex, whereas the feedforward connection from the retina via the LGN to V1 primarily targets layers 4 and 6. We will use laminar electrodes, which allow recording and stimulation of neural activity simultaneously in the different layers, to investigate whether it is possible and advantageous to stimulate specific layers. This information will help us to determine which layers should be targeted by the prosthesis to produce the most reliable percepts.

To summarize, we will iteratively develop a visual prosthesis composed of large numbers of electrode arrays through experiments in macaque monkeys. It is clear that to develop a visual prosthesis that is capable of producing complex, but coherent visual percepts, we need to answer critical questions about how higher brain areas represent objects, how the brain groups together visual objects and controls attention and eye movements. Each iteration of the prosthesis will integrate knowledge from previous iterations and knowledge gained from parallel experiments investigating representations in higher cortical areas, the processes for grouping, attention shifts, eye-movements and the effects of micro-stimulating different layers. By combining experiments that pilot development of the prosthesis with experiments that address areas where our knowledge is lacking, we hope to optimize the design and targets of the micro-electrode arrays to maximize our chances of producing a useful prosthesis to restore an increasingly rich form of vision to blind human patients. Note that in all experiments described in this project application the monkeys will retain normal sight. It is not necessary to lesion or damage the eyesight of the animals. An important advantage of this approach is that we will always be able to compare artificially induced perception (through microstimulation) to visual perception through normal eyesight.

Brindley, G.S., Lewin, W.S., 1968. The Sensations Produced by Electrical Stimulation of the Visual Cortex. *J. Physiol.* 196, 479–493.

Chen, K.H., Dammann, J.F., Boback, J.L., Tenore, F. V, Otto, K.J., Gaunt, R.A., Bensmaia, S.J., 2014. The effect of chronic intracortical microstimulation on the electrode-tissue interface. *J. Neural Eng.* 11, 26004.

10.2.e en 10.2.g

Dobelle, W.M.H., Mladejovsky, M.G., Girvin, J.P., 1974. Artificial Vision for the Blind: Electrical Stimulation of Visual Cortex Offers Hope for a Functional Prosthesis. *Science* (80-. ). 183, 440–444.

10.2.e en 10.2.g

Naumann, J., 2012. *Search for Paradise*. Xlibris Corporation.

10.2.e en 10.2.g

Schmidt, E., Bak, M.J., Hambrecht, F.T., Kufta, C. V, ORourke, D.K., Vallabhanath, P., 1996. Feasibility of a visual prosthesis for the blind based on intracortical microstimulation of the visual cortex. *Brain* 119, 507–522.

10.2.e en 10.2.g

---

### **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 aim of this study is to develop a visual prosthesis in macaque monkeys with the ultimate aim of translating this device to blind human patients after the work on this license is completed. It is advantageous to develop the prosthesis in macaque monkeys due to the great similarity between macaque and human visual systems and the ability to train these animals to report complex visual percepts. It is already clear from previous work in our lab and other labs that microstimulation of V1 leads to the perception of phosphenes and that macaque monkeys can be trained to report the location of these phosphenes. We have also a great deal of experience in training monkeys to make more complex discriminations, such as between different visually-presented letters. It is therefore highly feasible that macaque monkeys can be trained to discriminate between phosphene-based shapes. The first iteration of the prosthesis is already made and will shortly be implanted in the first animal as part of our ongoing DEC protocols (#3 in the attached document). It is therefore feasible that we will be able to complete these experiments within the timeframe of this license.

It is crucial to address areas where our knowledge is currently lacking in addition to piloting the development of the prosthesis to lay the foundations for increased functionality and sophistication of the prosthesis. A good parallel can be seen in the evolution of the methods and technology used for deep brain stimulation, to alleviate the symptoms of Parkinson's disease. Initially, early versions of DBS probes were used to reduce tremor and facilitate motor movements. Subsequent iterations of the DBS probes had increased functionality and incorporated deeper understanding of neural anatomy and circuits, allowing electrical currents to be 'steered' to specific areas of the tissue. We expect to develop increasingly sophisticated versions of the visual prosthesis, which requires parallel experiments addressing areas of the prosthesis design where our knowledge is lacking. The early versions of the prosthesis will likely still produce relatively crude visual percepts, however it should be noted that even crude percepts can dramatically improve the quality of life for patients. This has been seen in the development of retinal implants. Recently, results from the long-term use of retinal implants in patients have been reported, e.g. with the Argus I and the Argus II retinal implants, from Second Sight Medical Products. The improvement in vision is slight (visual acuity with the implant is 1.7-2.9 logMAR, i.e. the patients would not be able to read the largest letter on an eye-chart and are still technically 'blind'), but with the implant turned on the patients were significantly better at performing visual tasks, including object localization, motion of direction identification, letter reading, and orientation and mobility tasks. We aim to produce an implant after this five-year period that can be transferred to the first human trials and have a similar impact on the lives of retinally-damaged patients for whom retinal implants are not an option.

Our aims are achievable because:

- 1) Our lab has an established primate facility and the expertise to implant electrode arrays in visual cortex. Many of the techniques required to produce the prosthesis are already implemented in our lab. We also have a lot of experience training monkeys to report complex percepts. In addition, we have experience with optogenetic techniques from our work in rodents.
- 2) The lab collaborates with neurosurgeons. For example, we record single neuron activity from the medial temporal lobe of human patients in collaboration with leading academic hospitals in the Netherlands and abroad. These collaborations will help us to develop and implant the prostheses in a manner that will be suitable for eventual transfer to human patients. We have collaborations with ophthalmologists and experts on retinal processing. We also have strong scientific collaborations with companies that develop brain-computer interfaces, such as [10.2.g](#), a key collaborator on a [10.2.g](#) which aims to develop a visual prosthesis.
- 3) The lab is situated in an excellent research environment at [10.2.g](#), where the facilities that are required for this project are available.
- 4) Our lab has parallel research streams in humans (fMRI and behavior) and rodents (basic visual processing) and there is continuous interplay between these research projects so that hypotheses can be answered using the appropriate model.
- 5) The lab has an outstanding track record with high impact publications (Nature, Science, Nature Neuroscience, Neuron, PNAS, etc.). The work is funded in part [10.2.g](#) that aims to develop of visual prosthesis for blind people.

### 3.3 Relevance

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

#### Scientific relevance

The experiments described here will further our knowledge about the relationship between electrical micro-/optogenetic stimulation and phosphene perception. We know little about the effects of simultaneous micro-stimulation of multiple electrodes and the results will not only guide our design of the visual prosthesis but will also be of great interest to those designing brain-machine interfaces. Important aspects about the link between neural activity and visual perception have remained unknown. The contribution of neural activity in different layers, in different visual areas and at different time-points to forming the visual image is an area of active research and the answers will not only be of importance for the development of a visual prosthesis but also of fundamental importance to understanding the human brain.

#### Social relevance

The experiments described here will contribute to the design of a visual prosthesis aimed at bypassing the compromised retina of blind patients and directly transmitting camera images to the visual brain, hence creating artificial visual perception. 40 million people suffer from blindness worldwide. Patients with a damaged visual system can be classified into two groups: those for whom the damage occurs somewhere along the visual processing pathway up to and including the photoreceptor layer in the retina; and those for whom damage occurs after this processing stage. For the former group of patients, significant progress has been made towards solutions in the form of retinal prostheses, stem cell transplants, and gene therapy. However, these treatments only benefit patients in whom the retinal ganglion cells that connect the eye to the brain have been spared. According to estimates by the company Second Sight Medical Products, approximately 6 million blind people worldwide, including patients suffering from glaucoma, diabetic retinopathy, or optic nerve damage, will not be able to benefit from a retinal prosthesis. For these patients, whose sight cannot be restored via the retina, the long-held dream is hence to restore visual function by interfacing directly with the visual cortex. Furthermore, this project will contribute greatly to our understanding of how the brain gives rise to visual perception. Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public.

### 3.4 Research strategy

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

The main objective of the project is the development of a visual prosthesis aimed at restoring a limited form of vision to blind patients. The prosthesis will be developed through several iterations. In the first iteration, which is already ready for implantation, we will target the middle layers of the primary visual cortex of macaque monkeys with approximately 1000 electrodes and test the perception of shapes composed of patterns of phosphenes. In parallel experiments we will address critical questions where our knowledge is lacking to produce more sophisticated versions of the prosthesis in later iterations. The key questions we will address are:

- 1) Which layers should be targeted by the electrodes of the prosthesis and is it possible to micro-stimulate specific layers of cortex?
- 2) Is it possible to create perceptual grouping of phosphene patterns and figure-ground segregation by micro-stimulating higher visual areas together with V1?
- 3) Is it possible to direct attention to some phosphenes while ignoring others and how does this attention process impact on neural activity in higher brain areas, including those involved in the generation of eye movements?

These questions will be addressed in experiments in macaque monkeys implanted with intracranial implants such as laminar electrode arrays or recording chambers that allow simultaneous recording and micro-stimulation of neural activity. The results of these parallel experiments, combined with the findings from the first version of the prosthesis, will be used to design a second iteration of the prosthesis. In

addition to V1, the second iteration will target the higher visual areas and eye movement centers identified by us to be important for more eliciting complex perceptions, for figure-ground segregation and for shifts of attention. Depending on the results of these studies, and the findings from the second iteration it is highly likely that a third iteration will be required. In this version we will bring together the knowledge we have gained to produce a version of the prosthesis that can potentially be used in human trials.

The prosthesis can only be designed and tested in macaque monkeys. We need to critically assess whether the prosthesis can produce visual percepts of sufficient spatial resolution to be useful in humans. To do this we need to implant a large number of electrodes into visual cortex, then train an animal to report their micro-stimulation induced percept, while keeping their eyes still ('fixating'). These critical factors rule out all other animal models. Rodents have a small visual cortex and it wouldn't be physically possible to implant enough micro-electrodes to produce complex percepts. Furthermore, there are many differences between the organization of the rodent and human visual system, including the fact that the rodent retina lacks a fovea, has very poor spatial resolution and their primary visual cortex is poorly layered and lacks orientation columns. Larger animals such as pigs and cats have larger visual cortices but cannot be trained to fixate and report their visual percepts. Macaque monkeys on the other hand have a visual system that is very similar to that of humans, with a foveated retina and a large, well-organized visual cortex. Furthermore, we know a great deal about the functioning of the macaque visual system, including the eye-movement control centers and higher visual areas, and our experiments will build on this knowledge. These facts make the macaque monkey the only suitable species for carrying out these experiments.

The prosthesis will be developed in the experiments described in Appendix 3.4.4.1. The prosthesis consists of multiple, large-scale multi-electrode arrays, which can be targeted to different regions of the visual cortex of macaque monkeys. These arrays allow us to electrically stimulate neural activity with small currents leading to perception of small patches of light ('phosphenes'). Monkeys will be trained to report their percepts using shape/letter discrimination tasks (see Fig. 1A, with a pictorial illustration for transmitting the letter "A"). They will initially be trained using the traditional approach of showing visual stimuli on a screen, but after the prosthesis is implanted we will use micro-stimulation of the brain to induce phosphene-based shapes and letters. In addition, we can use these arrays to record neural activity and investigate the neural effects of microstimulation. Neural recordings will also be used to calibrate the levels of current that are necessary to produce a phosphene. With more than 1000 electrodes it will not be feasible for patients to adjust the current strength for one electrode at a time while asking the patients if they perceive a phosphene, as has been the standard procedure (Brindley and Lewin, 1968; Dobelle et al., 1974; Schmidt et al., 1996). It would therefore be useful to create methods based on the recording of activity from adjacent electrodes to perform automatic calibrations of current thresholds. The prosthesis will be developed through several iterations. At each iteration, the prosthesis will become more sophisticated, targeting more and more relevant brain areas and particular cortical layers based on the results from the experiments described in Appendix 3.4.4.2.

The experiments described in Appendix 3.4.4.2 are designed to provide extra knowledge that is required to develop a more sophisticated version of the prosthesis. The specific questions related to the design of the prosthesis are outlined above. The approach for each question is as follows:

- 1) We will use implanted laminar electrode arrays or acute laminar electrode recordings to allow us to record and micro-stimulate the different layers of cortex. We will assess whether it is feasible to stimulate a particular layer and investigate the effects of stimulation of different layers on the quality of the phosphenes. Animals will be trained to report the quality of the phosphene (i.e. its size, color, movement) using discrimination tasks and delayed match-to-sample tasks.
- 2) In separate animals, we will implant micro-electrode arrays in higher and lower visual areas to allow simultaneous recording and stimulation of these areas. We will examine whether it is possible to induce higher level percepts and figure-ground segregation and perceptual grouping of phosphenes through stimulation of particular higher visual areas. The monkeys will be trained to perform tasks that probe higher level percepts and perceptual grouping (e.g. figure-ground segmentation and object-based attention).
- 3) Additionally, we will target attention/eye-movement control centers by implanting recording chambers

over brain areas involved in directing attention and the planning of eye movements. These areas are candidates for implantation in future, more sophisticated versions of a neuroprosthesis. The recording chambers allow access to the brain via a craniotomy and acute recordings of neural activity will be made using individual electrodes. These experiments may be combined with the implantation of electrode arrays in visual cortex to determine (i) how micro-stimulation in eye-movement centers interacts with activity in visual cortex and (ii) how microstimulation of visual cortex influences the activity in the eye movement structures.

The overall strategy requires two types of animal procedures as outlined in section 3.4.2.

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.

#### **3.4.2.1 Visual prosthesis development and phosphene tasks**

In these experiments we will develop and test several iterations of a visual prosthesis in macaque visual cortex. A newly acquired animal follows a highly standardized training program which acclimatizes the monkey to the primate facility and takes the monkey up to the point where they can perform simple visual tasks in daily training sessions. These initial stages have been carefully optimized and are often performed by the well trained animal caretakers of the facility. This standardization ensures a very high success rate acclimatizing monkeys to the facility and the training routine. Monkeys are obtained from the national primate center or in exceptional cases from licensed importers if there are no appropriate animals available at the primate center. They are socially housed in the facility, typically in pairs. After acclimatization to the new environment the monkeys are trained to move into a primate chair that allows them to be moved comfortably from their home-cage to the experimental set-up. Once the animal can sit quietly in the chair for periods of >1 hour the animal undergoes a surgery to implant a head-post. The head-post is a small rod attached to the skull of the animal and it is used to fixate the head of the monkey during training and later electrophysiological recordings. This is an essential step because we train the monkey to control its eye position and these measurements are only possible if the monkey's head is fixed. After recovery from the head-post surgery, the animal is acclimatized to having his head fixated in the chair. Most monkeys adapt very quickly to this step. The monkey then begins daily training sessions in which he acquires juice rewards for performing simple eye-movement or hand-movement based tasks. Initially the tasks are very simple, such as directing his gaze ('fixating') on a large dot on a computer screen for a few hundred milliseconds. During this process the animal will be placed on a controlled fluid uptake regime. Gradually the difficulty of the tasks is increased by making the dot smaller until the animal can fixate, then make guided eye-movements towards visual targets after the presentation of a 'go' cue. At this stage, the animal is ready to be trained on more complex perceptual tasks. The animal will be trained to perform tasks that involve visual stimuli made from small spots of light that resemble phosphenes. For example, we will train the animals to distinguish between complex visual stimuli (e.g. letters) composed of small spots of lights. Training the animals on tasks like this will ready them for later stages in which they will have to report their perception following microstimulation. Once the animals reach high levels of performance we will implant the first group of animals with the first iteration of the neural prosthesis. The prosthesis consists of multiple arrays containing large numbers of microelectrodes (approximately 1000 electrodes) implanted into primary visual cortex. Following recovery from this surgery the animals will be tested by micro-stimulating multiple electrodes simultaneously to artificially create perception of the same stimuli that the animals were previously trained on. At the same time as the microstimulation is applied, we will record neural activity through the microelectrodes to determine the effects of microstimulation and correlate this activity with the animal's success/failure on the task. We will critically evaluate whether it is possible to create complex percepts using the arrays before proceeding with the following two groups.

In a second group of animals we will implant the second iteration of the prosthesis, incorporating knowledge gained from the first iteration and the results from the experiments described in Appendix 3.4.4.2. The animals will be trained on the same tasks as the first iteration with the addition of tasks that introduce more natural visual images and test the ability of the animal to segregate phosphene-based objects from their backgrounds. The prosthesis will be targeted to V1 and the brain areas that will be identified in the experiments of Appendix 3.4.4.2 as being critical for the perception of more complex shapes and figure-ground segregation. The procedures applied will otherwise be identical to the first group of animals.

In the final group, we will take the knowledge we have gained from the first two groups to develop a final iteration of the prosthesis which would be suitable for implantation in human patients. The procedures will be identical to the first two groups, but it is likely that the tasks will become more naturalistic still and we will test whether it is possible to direct attention to some phosphenes while ignoring others.

#### **3.4.2.2 Intracranial implants and performance on complex tasks.**

The experiments of this study will address critical questions that need to be answered to produce more sophisticated versions of the prosthesis. The initial training of the animals will be identical to that described in section 3.4.2.1. Once the animal has reached high levels of performance on the basic tasks they will be trained on more complex perceptual tasks that test phosphene perception and perceptual organization, for example, tasks in which the animal must perceptually group together particular phosphenes and segregate these from their background. Monkey will be trained to report their percept using an eye-movement, or in some control cases, a hand-movement.

After reaching sufficient levels of performance on the tasks the monkey will undergo surgery to chronically implant a maximum of two of the following implants:

- i) A set of 2D multi-electrode 'Utah' arrays and their associated connector, similar to those described in 3.4.2.1 but smaller in scale. These arrays are available in a variety of different sizes (e.g. 5x5 electrodes or 10x10). These arrays are implanted in V1 and in higher cortical areas and allow the chronic measurement of neural activity over a period of many months and even years. The small connector which provides electrical contact with the electrodes is surgically attached to the skull.
- ii) A set of 3D laminar electrode arrays and their associated connector. These chronic arrays contain multiple laminar macro-electrodes arranged as a 3D matrix of electrode sites. Each macro-electrode is composed of a vertical array of electrode contacts allowing simultaneous recordings of neural activity from each cortical layer. The vertical arrangement of the electrodes allows us to record and stimulate particular layers. The small connector which provides electrical contact with the electrodes is surgically attached to the skull.
- iii) Recording chamber. This is placed directly above brain areas of interest and a craniotomy is performed allowing access to the underlying brain tissue using traditional single electrodes or multi-contact laminar electrodes.

The maximum of two intracranial implants is for the lifetime of the animal, and does not include the head-post. For example, an animal may receive a head-post, a set of 2D arrays and a recording chamber. After this, the maximum has been reached, and the animal may not receive any further implants.

These intracranial implants will be targeted to different areas depending on the research questions and it is also possible that the animals receive a mixture of implants, for example a recording chamber over the superior colliculus and Utah electrode arrays in V1. The choice of implant will depend on the area that is targeted. For example, areas such as V2 and V3 are difficult to target with Utah arrays as they lie within a sulcus, and access requires longer electrodes. Areas such as V1 and V4 lie on gyri and can be accessed using Utah arrays. The use of 3D laminar or 2D arrays will depend upon the experimental questions.

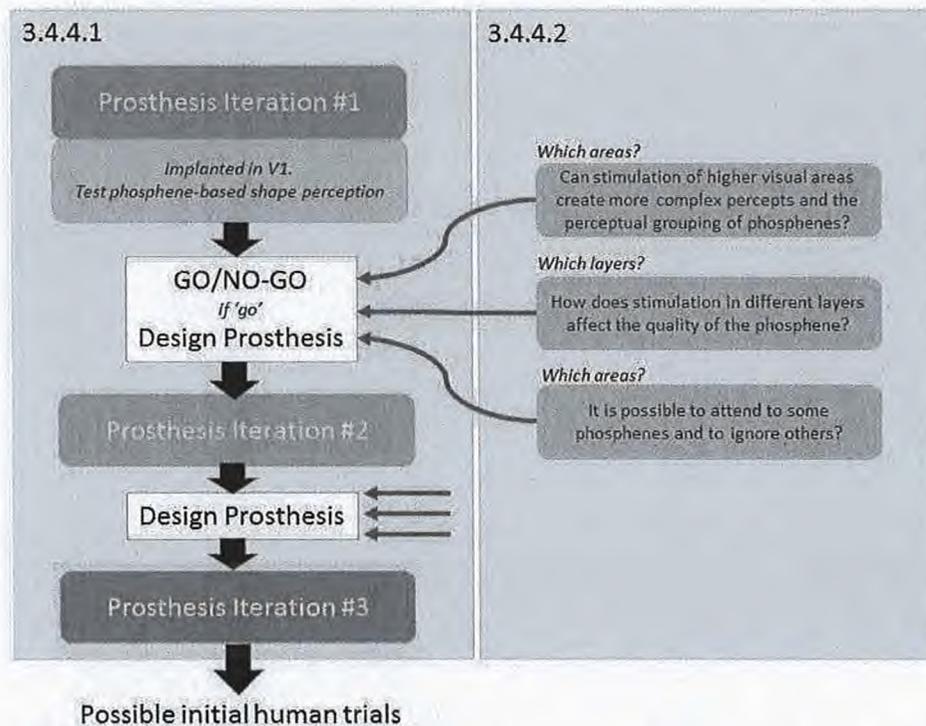
After recovery from the implantation surgery we will simultaneously record and micro-stimulate neural activity while the monkeys perform the perceptual tasks. We will relate the neural activity profiles observed to the success of the animal on the tasks. We will micro-stimulate electrodes to produce phosphene percepts and investigate the relationship between the area/layer that is stimulated and the quality of the phosphene percept that is produced.

---

#### **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 components described above are all aimed at developing a visual prosthesis, which has the potential to restore a limited form of vision to blind patients. We will design, implant and test different iterations of a neural prosthesis consisting of many hundreds of electrodes in macaque monkeys (3.4.4.1). In parallel we will address outstanding questions which need to be answered to produce a more sophisticated version of the prosthesis capable of producing complex and coherent visual percepts

(3.4.4.2). The relationship between these different aspects of the project is outlined in the diagram below. The first version of the prosthesis has already been designed and aims to produce perception of simple shapes in macaques through microstimulation of V1. In parallel we will test in separate experiments whether it is possible to elicit more complex percepts and to group together individual phosphenes into a coherent object by stimulating neurons in higher visual areas that represent objects and centers that control attention and eye movements. In addition, we will stimulate the different layers of V1 and higher visual areas using laminar electrodes to test whether stimulation in different layers leads to different qualities of phosphene perception.



**Figure 3** – Coherence between the different animal experiments. The prosthesis will be developed as part of the experiments described in 3.4.4.1. The first prosthesis targets V1. In parallel we will run experiments in other animals testing the questions outlined in purple (3.4.4.2). The answers to these questions will inform the design of the second and third iterations of the prosthesis as indicated by the purple arrows. The go/no-go moment is determined by whether it is possible to train monkeys to report phosphene-based shapes. The ultimate goal is to produce a prosthesis that can be moved to human trials.

The results of these experiments will be used to design the second version of the prosthesis targeting multiple areas and layers of visual cortex. The results from the first iteration of the prosthesis act as a go/no-go moment. If we cannot create the perception of simple shapes using phosphenes then it is unlikely that more advanced forms of the prosthesis will be useful. If the go moment is passed, we will implant a new group of animals with the second iteration.

During testing of the second iteration we will continue our experiments investigating the role of higher visual areas and eye-movement centers in higher level perceptions and grouping to further refine our knowledge about the effects of micro-stimulating these regions. This knowledge will be brought together in a final iteration of the prosthesis which will be implanted and tested to determine if monkeys can successfully segregate phosphene-objects from their backgrounds and attend/plan eye movements to these objects.

Some animals will be reused from other appendices or future CCD licenses. Re-use is an important aspect of macaque research, the animals are trained for many months and receive intracranial implants which can be functional for years. These animals can be retrained very quickly to perform other tasks and in many cases, experiments can be completed without the need for extra surgical implantations. This leads to an overall reduction in the number of animals used as each animal can take part in multiple research questions.

There is overlap between the animal studies described in this project and those in ongoing DEC-approved protocols, before the new law came into effect. We have described these protocols in an attached document entitled: "Overview of DEC protocols currently in progress". After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under this new license and we will write new study protocols to replace the current DEC protocols. The study protocols will be judged by the IvD of our institute. The monkeys which are currently assigned to these DEC protocols will be included in the number of animals requested for this project. We will transfer a total of 5 animals from the ongoing DEC protocols to this license.

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	Visual prosthesis development and phosphene tasks
2	Intracranial implants and performance on complex tasks
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## Overview of DEC protocols currently in progress

The following DEC protocols would fall under the license if approved. The number of monkeys indicated shows the current number of monkeys assigned to that DEC protocol. These monkeys would then fall under the new CCD license and count towards the total number of monkeys. We will submit new study protocols that will replace these DEC protocols once the license has been granted.

### #1 - Micro-stimulation of visual areas during attentional tasks

In this project we apply micro-stimulation to areas V1 and V4 of monkeys engaged in a figure-ground segregation task. The project assesses how communication between different brain areas interacts with the visual stimulus. The results show that the effects of micro-stimulation of V4 depend upon the timing of the stimulation relative to stimulus onset as well as the figure-ground compartment that the cell is responding to. Micro-stimulating V4 has no effect on baseline V1 activity, but causes suppressive effects if the micro-stimulation is triggered during the later sustained phase of firing. This shows that the relative timing of micro-stimulation in different areas could be critical for modulating phosphene perception. The monkey that is assigned to this protocol has received a head-post and has not undergone more than moderate discomfort.

*Would become part of: 3.4.4.2*

*Current number of monkeys assigned = 1.*

### #2 – The role of the superior colliculus in figure-ground segregation

In this project we make single-neuron recordings from the superior colliculus of monkeys engaged in a figure-ground segregation task. The experiment investigates the contribution of eye-movement centers to visual perception and the transformation of a visual percept to an eye-movement. Results show that SC superficial layers show figure-ground modulation and that deeper layers average this modulation across space to produce an eye-movement vector. The results show that eye-movement centers are sensitive to the grouping of perceptual objects and could be important sources of top-down modulation observed in the visual cortex.

The two monkeys on this protocol have received a head-post and one recording chamber. The animals have not experienced more than moderate discomfort.

*Would become part of: 3.4.4.2*

*Current number of monkeys assigned = 2.*

### #3 – The creation of visual images with microstimulation of the visual cortex

In this project we implant arrays with large numbers of microelectrodes in visual cortex. This is the first iteration of the visual prosthesis. The animals are trained to report the identity of complex visual objects. After implantation we micro-stimulate these electrodes to create phosphene patterns and test whether the animal can correctly report their shape. The animals assigned to this protocol have received head-posts and have been trained on the letter discrimination task. Both animals are able to learn the task. The first animal will be implanted with electrodes shortly. They have not experienced more than moderate discomfort.

*Would become part of: 3.4.4.1*

*Current number of monkeys assigned = 2.*

**Total number of monkeys that would fall under the new license = 5 animals.**

## Animal Numbers

Appendix 3.4.4.1: 6 animals with option of 1 extra animal.

Appendix 3.4.4.2: 6 animals with option of 1 extra animal.

**Total number of animals requested = Maximum 14.**

Of these, 5 animals are already assigned to current DEC protocols and will be transferred to this license.

**The maximum number of new animals that will be acquired is 9.**

The actual number of animals used is likely to be lower than this due to re-use of animals within this license and from animals assigned to future licenses. We estimate the frequency of re-use to be around one half, **meaning that the total number of animals used will be around  $(12 \text{ to } 14)/(1+1/2) = 8-10$  animals.**

## Appendix 3.4.4.1 Visual Prosthesis

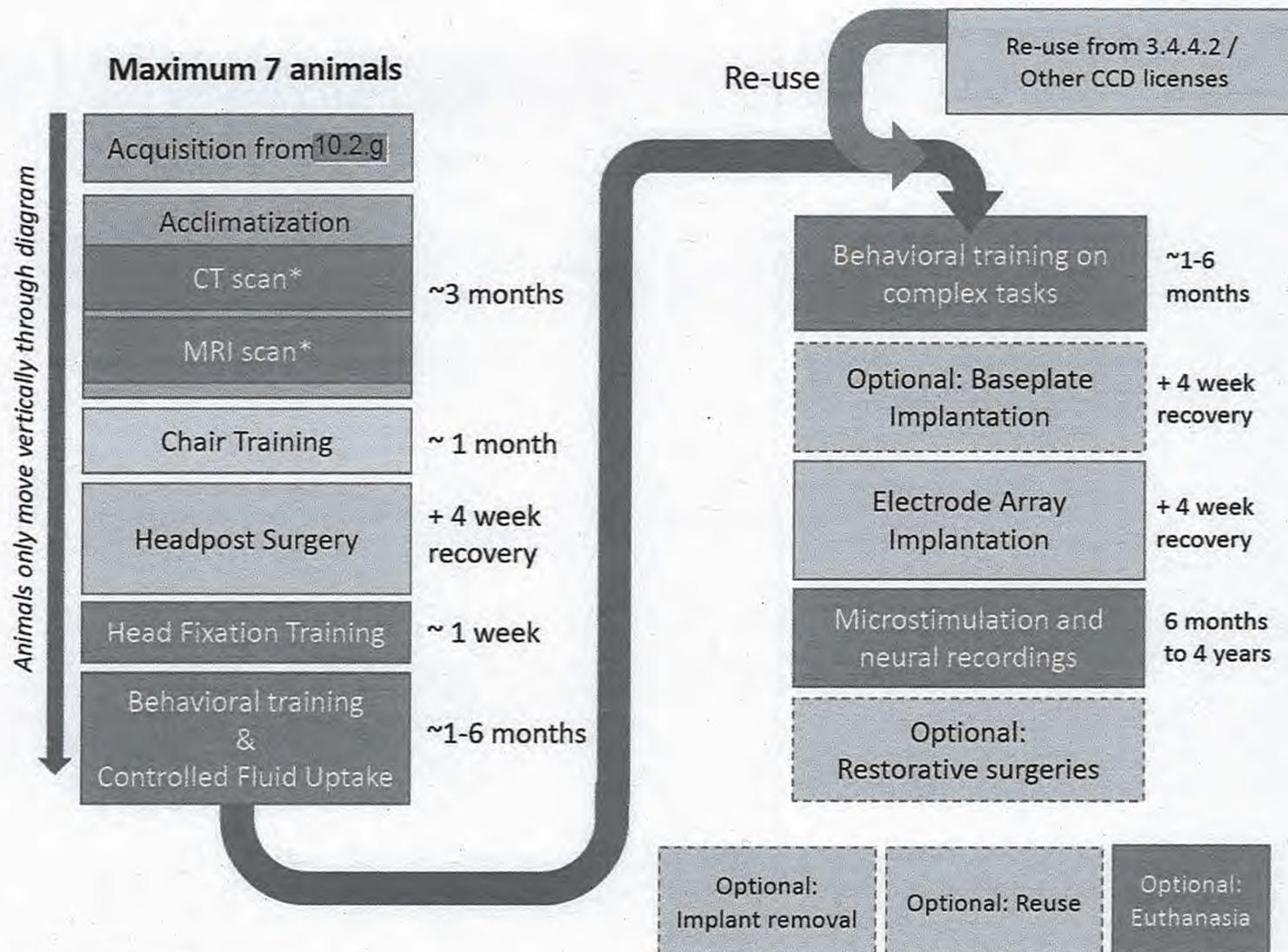
### N = 6 + 1 animals

6 animals required to answer research questions.

Permission for 1 extra animal in the case of inconsistent data or problems with one animal.

We estimate that ~50% of animals will come from re-use from this /other appendices or other licenses.

*\* Under the condition that an individual animal has a maximum of 2 intracranial implants (e.g. electrode arrays or recording chambers)*



### Discomfort:

none

mild

moderate<1day

moderate>1day

## Appendix 3.4.4.2 Intracranial implants and performance on complex tasks.

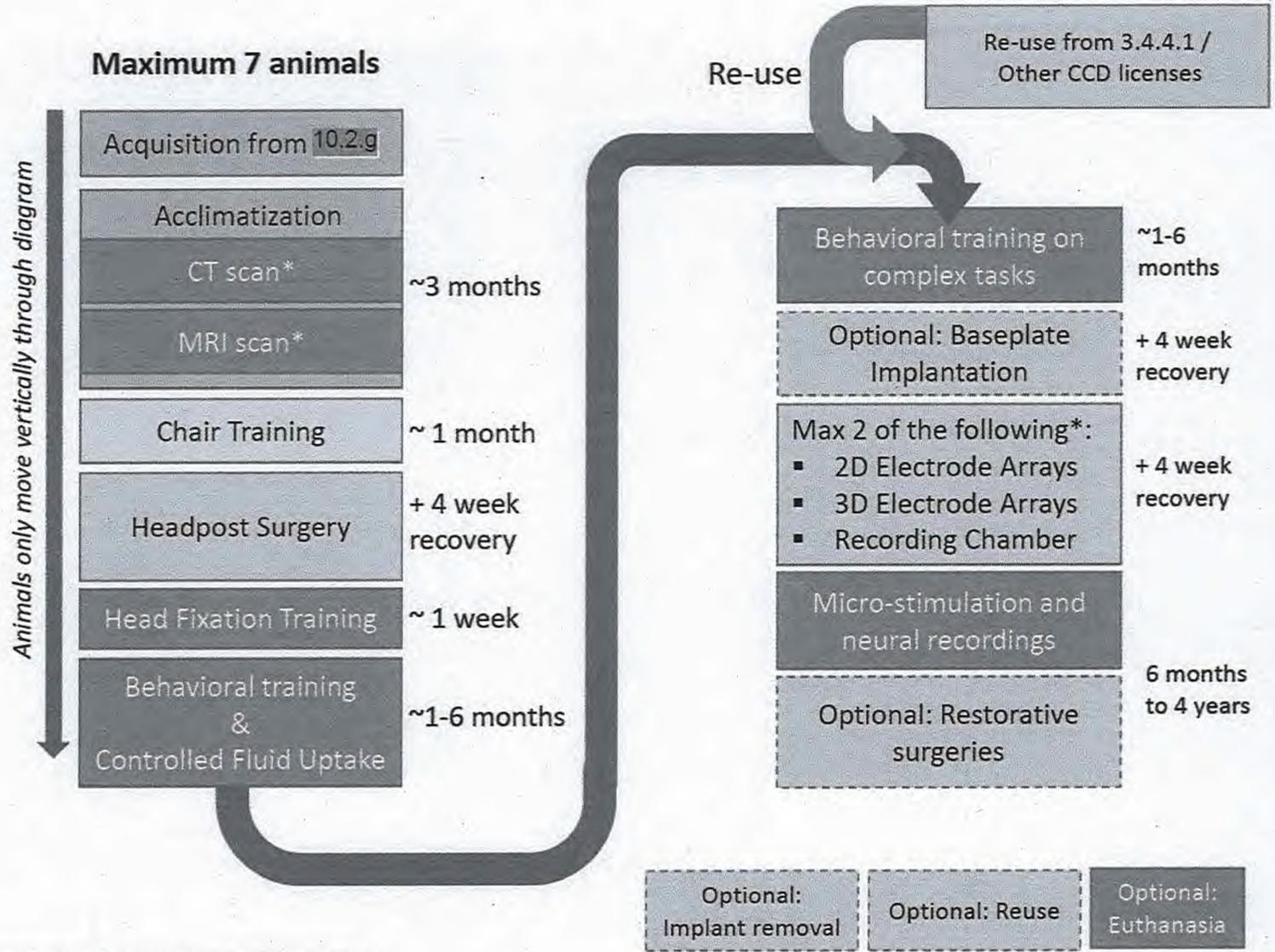
### N = 6 + 1 animals

6 animals required to answer research questions.

Permission for 1 extra animal in the case of inconsistent data or problems with one animal.

We estimate that ~50% of animals will come from re-use from this /other appendices or other licenses.

*\* Under the condition that an individual animal has a maximum of 2 intracranial implants (e.g. electrode arrays or recording chambers)*



### Discomfort:

- none
- mild
- moderate<1day
- moderate>1day

Research strategy	Population of users	Advantages	Disadvantages	Examples
Retinal gene therapy	Blind people who sustain limited damage to retinal layers (i.e. part of the retina remains intact AND a sufficient number of photoreceptors remain)	The high spatial and temporal capabilities of the retina are preserved. The course of retinal disease is slowed or even reversed. Generates visual percepts	Not feasible for people with extensive damage to the retina or optic nerve. Involves injection of genetically modified virus into the eye, with risk of infection and surgical complications	Scheie Eye Institute <sup>1,2</sup>
Retinal pharmaceutical therapy	Blind people who sustain limited damage to retinal layers (i.e. part of the retina remains intact AND a sufficient number of photoreceptors remain)	The high spatial and temporal capabilities of the retina are preserved. The course of retinal disease is slowed or even reversed. Generates visual percepts	Not feasible for people with extensive damage to the retina or optic nerve. Involves injection of drug agent into the eye, with risk of infection and surgical complications. Frequent replenishment of pharmaceuticals may lead to serious side effects	Campochiaro et al. <sup>3</sup> , Iturralde et al. <sup>4</sup>
Retinal cell transplants/ stem cell transplants	Blind people who sustain limited damage to retinal layers (i.e. part of the retina remains intact)	Feasible for patients with insufficient photoreceptors. The high spatial and temporal capabilities of the retina are preserved. Generates visual percepts	Not feasible for people with extensive damage to the retina or optic nerve. Involves surgical intervention, or injection of genetically modified cells into the eye, with risk of infection and surgical complications	Falkner-Radler et al. <sup>5</sup> , Schwartz et al. <sup>6</sup>
Retinal electrical prosthesis	Blind people who sustain limited damage to retinal layers (i.e. part of the retina remains intact)	Less invasive than a cortical implant. Uses existing cortical processing machinery. Generates visual percepts	Not feasible for people with extensive damage to the retina or optic nerve. Involves implantation of a prosthesis in the eye, with risk of infection and surgical complications. Amount of information transmission is limited by size of electronics that can be attached to retina	Argus II (Second Sight) <sup>7</sup> , Retina Implant Alpha IMS <sup>8,9</sup>
Sensory substitution	Blind people with intact non-visual sensory organs (e.g. audition or touch)	Non-invasive, no risk of infection or surgical complications	Low volume and/or rate of information transmission. Takes extensive training to learn to interpret cross-modal signals. Does not generate visual percepts	The vOICE, EyeCane <sup>10</sup> , EyeMusic <sup>11</sup> , Tactile Vision Sensory Substitution <sup>12,13</sup> , Haptic Belt <sup>14</sup> , VibroGlove <sup>15</sup>

Optic nerve electrical prosthesis	Blind people who sustain extensive damage to retina, but whose optic nerve remains intact	Feasible for patients with extensive damage to the retina. Generates visual percepts	Invasive, requires implantation of optic nerve prosthesis, with risk of infection or surgical complications. Poor control over visual percepts due to low spatial resolution	Veraart et al. <sup>16,17</sup> , AV-DONE <sup>18</sup>
Cortical electrical prosthesis	Blind people who sustain extensive damage to retina and/or optic nerve, but whose visual cortex remains intact	Feasible for patients with extensive damage to the retina, optic nerve, and/or lateral geniculate nucleus. Uses existing cortical processing machinery. Generates visual percepts	Invasive, requires implantation of cortical prosthesis, with risk of infection or surgical complications. Amount of information transmission is limited by size of electronics that can be implanted in brain	Brindley et al. <sup>19</sup> , Dobbins et al. <sup>20,21</sup> , Schmidt et al. <sup>22</sup> , Troyk et al. <sup>23,24</sup> , Monash Vision <sup>25</sup> , ASSIST

Below, we list the research teams that currently aim to develop a visual prosthesis. However, they have not addressed the task of covering a large portion of the visual field through a high-resolution interface, and it remains unknown whether patterned stimulation of visual cortex gives rise useful percepts. Our approach focuses on this missing technology.

- The Pezaris Visual Prosthesis lab at Harvard University focuses on the implantation of the lateral geniculate nucleus (LGN) of the thalamus, which is challenging to access. The LGN is much smaller than the primary visual cortex (by a factor of 46), which is why we chose to target the primary visual cortex.

- The Troyk lab at the Illinois Institute of Technology (IIT) has developed a compact, wireless neuroprosthetic device with 16 electrodes, which has been implanted in the rat sciatic nerve, but no results in the visual cortex have been published. In this approach, the wireless components take up a large surface area relative to the array of electrodes so that the total number of electrodes in V1 is limited and targeting of the visual field representation in the depth of the calcarine sulcus (which contains most of V1) has not yet been addressed.

- The Vision Group at the University of Monash has developed a compact, wireless neuroprosthetic device with 43 microstimulating electrodes. Thus far, the device has been tested in-vitro on tissue slices, but the efficacy of the device in a live animal is unknown. Furthermore, reports indicate that the team ran into difficulties with the coating of their implant, preventing long-term implantation. Finally, as with the IIT device, implantation in the human calcarine sulcus (site of V1) would be very difficult.

- Second Sight Medical Products, Inc. is planning to carry out clinical trials with a cortical prosthesis, called Orion I, which will have only 60 surface electrodes. This approach will only convey coarse percepts in restricted areas of the visual field, because approximately two-thirds of primary visual cortex is hidden in the calcarine sulcus and is inaccessible to surface electrodes.

## References

1. Maguire, A. M. *et al.* Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med* **358**, 2240–2248 (2008).
2. Hauswirth, W. W. *et al.* Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Human Gene Therapy* **19**, 979–990 (2008).
3. Campochiaro, P. A. *et al.* Long-term Outcomes in Patients with Retinal Vein Occlusion Treated with Ranibizumab: The RETAIN Study. *Ophthalmology* **121**, 209–219 (2014).
4. October 26, 2. Veterans' Health Care Issues in the 109th Congress. 1–58 (2006).
5. Falkner-Radler, C. I. *et al.* Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* **95**, 370–375 (2010).
6. Schwartz, S. D. *et al.* Articles Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet* **379**, 713–720 (2012).
7. Stronks, H. C., Barry, M. P. & Dagnelie, G. Electrically Elicited Visual Evoked Potentials in Argus II Retinal Implant Wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 3891–3901 (2013).
8. Wilke, R. *et al.* Spatial Resolution and Perception of Patterns Mediated by a Subretinal 16-Electrode Array in Patients Blinded by Hereditary Retinal Dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 5995–6003 (2011).
9. Hafed, Z. M., Stingl, K., Bartz-Schmidt, K.-U., Gekeler, F. & Zrenner, E. Oculomotor behavior of blind patients seeing with a subretinal visual implant. *Vision Research* 1–13 (2015). doi:10.1016/j.visres.2015.04.006
10. Maidenbaum, S. *et al.* The 'EyeCane', a new electronic travel aid for the blind: Technology, behavior & swift learning. *Restorative Neurology and Neuroscience* **32**, 813–824 (2014).
11. Levy-Tzedek, S., Hanassy, S., Maidenbaum, S. & Amedi, A. Fast, accurate reaching movements with a visual-to-auditory sensory substitution device. *Restorative Neurology and Neuroscience* **30**, 313–323 (2012).
12. Bach-y-Rita, P., Tyler, M. E. & Kaczmarek, K. A. Seeing with the Brain. *International Journal of Human-Computer Interaction* **15**, 285–295 (2003).
13. Bach-y-Rita, P. & W Kercel, S. Sensory substitution and the human-machine interface. *TRENDS in Cognitive Sciences* **7**, 541–546 (2003).
14. McDaniel, T., Krishna, S., Balasubramanian, V., Colbry, D. & Panchanathan, S. Using a Haptic Belt to Convey Non-Verbal Communication Cues during Social Interactions to Individuals who are Blind. in *IEEE International Workshop on Haptic Audio Visual Environments and their Applications* 1–6 (2009).
15. Krishna, S., Bala, S., McDaniel, T., McGuire, S. & Panchanathan, S. VibroGlove: An Assistive Technology Aid for Conveying Facial Expressions. in *CHI* 1–6 (2010).
16. Brelén, M. E., Duret, F., Gérard, B., Delbeke, J. & Veraart, C. Creating a meaningful visual perception in blind volunteers by optic nerve stimulation. *J Neural Eng* **2**, S22–S28 (2005).
17. Veraart, C., Wanet-Defalque, M.-C., Gerard, B., Vanlierde, A. & Delbeke, J. Pattern Recognition with the Optic Nerve Visual Prosthesis. *Artificial Organs* **27**, 996–1004 (2003).
18. Nishida, K. *et al.* Visual Sensation by Electrical Stimulation Using a New Direct Optic Nerve Electrode Device. *Brain Stimulation* 1–16 (2015). doi:10.1016/j.brs.2015.03.001
19. Brindley, G. S. Effects of Electrical Stimulation of the Visual Cortex. *Human Neurobiology* **1**, 281–283 (1982).
20. Dobbelle, W. H., Mladejovsky, M. G. & Girvin, J. P. Artificial Vision for the Blind: Electrical Stimulation of Visual Cortex Offers Hope for a Functional Prosthesis. *Science* **183**, 440–444 (1974).
21. Dobbelle, W. H. & Mladejovsky, M. G. Phosphenes Produced by Electrical

Stimulation of Human Occipital Cortex, And Their Application to the Development Of a Prosthesis for the Blind. *The Journal of Physiology* **243**, 553–576 (1974).

22. Schmidt, E. M. *et al.* Feasibility of a visual prosthesis for the blind based on intracortical micro stimulation of the visual cortex. *Brain* **119**, 507–522 (1996).

23. Troyk, P. R. *et al.* Intracortical Visual Prosthesis Research – Approach and Progress. in *Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference* 1–4 (2005).

24. Troyk, P. R. & Srivastava, N. R. Determining the Feasibility of an Intracortical Visual Prosthesis. in *13th Annual Conference of the International Functional Electrical Stimulation Society* 1–3 (2008). at

<[http://ifess.org/proceedings/IFESS2008/IFESS2008\\_061\\_Troyk.pdf](http://ifess.org/proceedings/IFESS2008/IFESS2008_061_Troyk.pdf)>

25. Lowery, A. J. Introducing the Monash Vision Group's Cortical Prosthesis. in *2003 13th IEEE International Conference on Image Processing ICIP* 1536–1539 (2003).



## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.1	<b>Visual prosthesis development and phosphene tasks</b>

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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 procedures described in this appendix concern the development, validation and study of a visual neuroprosthesis device.**

Our goal is to develop an implantable neuroprosthetic device for restoration of vision to the blind, by developing a state-of-the-art neural interface and conducting proof-of-concept testing in non-human primates (NHPs). The present experiments are necessary as ground work before we can apply for ethical approval to implant electrode arrays in blind (human) individuals. The monkeys in these procedures will be implanted with large numbers of micro-electrodes in cortical visual areas. By electrically stimulating these micro-electrodes with micro-ampere currents ('micro-stimulation') it is possible to induce visual percepts known as 'phosphenes'. The goal of these procedures is to produce complex visual percepts by stimulating multiple electrodes simultaneously and training monkeys to report these percepts.

The primary outcome parameters are:

i) The behaviour of the animal. The animal will be trained to report complex visual percepts such as letters and shapes. We will study how different electrical micro-stimulation paradigms lead to different visual percepts.

ii) Neural activity recorded from the electrode arrays. We will examine the effects of the microstimulation on neural activity recorded in visual cortex.

We envisage that it will be necessary to proceed through at least three iterations of the design of the

prosthesis before it is possible to move to human trials.

**Iteration #1:** Can micro-stimulation of large electrode arrays produce complex visual percepts? We know already that micro-stimulation of V1 produces phosphenes. Can we stimulate multiple electrodes simultaneously to produce patterns of phosphenes that form shapes? How does stimulation in one visual area influence the activity in another area? This iteration of the prosthesis has already been designed under one of our ongoing DEC protocols and we will shortly implant the first animal.

**Iteration #2:** We will use information gained from the experiments of 3.4.4.2 to improve the design of the phosphene in the following areas:

*Depth of the electrodes:* our experiments with laminar electrodes will determine which depth is optimal for the implantation of the micro-electrodes.

*Higher visual areas:* our experiments with arrays in multiple visual areas will determine if it is possible to produce more complex percepts by stimulating other visual areas. These areas will be targeted by this iteration.

*Attention:* Behavioural tests combined with recordings from higher areas will determine if it is possible to direct attention to some phosphenes and to ignore others. How does attention to a set of phosphenes influence the representation of these artificial visual perceptions in other (higher) brain areas

**Iteration #3:** We will use the results gained from iteration #2 along with further results from the experiments of Appendix 3.4.4.2 to further improve the design of the prosthesis. The goal of this iteration is to determine whether monkeys can discriminate more natural visual objects that are presented to the visual cortex, purely through the use of micro-stimulation. If so, the prosthesis is ready for transfer to human studies.

For each iteration, the monkeys will be acquired and acclimatized to the primate facility at **10.2.g** They will undergo structural anatomical scans to guide the design of the surgical implants. It is critical for the success of these experiments that the monkey's head is held stationary during the stimulation/recordings as we need to be able to precisely measure the eye position of the animal, which is impossible if the head is moving. The animal will be implanted with a custom-designed head-post which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up. The animals will then be placed on a controlled fluid uptake regime and trained on initial eye-movement related tasks. Once they have reached high levels of performance they will then be trained on tasks that require them to perform complex visual discriminations using stimuli that simulate phosphene perception (e.g. letter discrimination using letters composed of small spots of light). Once trained the animals will be implanted with arrays of microelectrodes in different brain areas. After recovery from the implantation we then begin electrophysiological experiments in which the microelectrodes are stimulated and neural activity is monitored through the electrodes while animals perform the visual tasks and tasks in which they report about the phosphenes induced by microstimulation. In all experiments described here the monkeys will retain their normal vision. It is not necessary to blind the animals. This gives the advantage that we can always compare artificially induced perceptions to visual perception through normal sight.

Animals may be assigned to this protocol after completing experiments described in appendix 3.4.4.2. These animals will already have been trained to perform complex tasks and will have received a head-post and an intracranial implant. Animals may also be transferred to this protocol from other CCD approved licenses, but only if the animals have not experienced serious discomfort. The animal will be implanted with a set of electrode arrays with the condition that an individual animal can receive a maximum of two intracranial implants in their lifetime (e.g. 2 sets of arrays or a set of arrays and a recording chamber) in addition to the head-post. For example, an animal that completes the experiments of Appendix 3.4.4.2 may receive a head-post and a recording chamber. They can then be transferred to this procedure and receive a further implant (i.e. a set of electrode arrays) bringing the total number of intracranial implants to two (which is the maximum).

---

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

---

### **Acquisition and housing**

Monkeys will be obtained from a licensed breeding facility. In all cases we will first try to obtain our animals from a national primate center. Only under exceptional circumstances (no monkeys available at a primate center) we will get them from a licenced importer. Monkeys will be housed in the primate facility of our institute. All animals are male and typically between 4-5 years of age when they arrive. This is the age at which young male monkeys typically leave their social group. We typically acquire two cage-mates together and these are then pair-housed for 3-4 weeks in a cage in isolation from the other monkeys (for quarantine reasons). When the results of viral and bacteriological tests are shown to be negative we can, if desired, pair these monkeys with established members of the group. We consult an ethologist from a national primate centre who advises us on appropriate pairings. This can be desirable to form stable pairings or larger groups (if social character of the animals allows it). Our facility contains large cages and the monkeys will have access to a floor-to-ceiling play cage, which allows them to climb and swing. The play cage also contains a 'look-out' platform where the monkeys can view other monkeys in the facility. The environment will be enriched with toys (e.g. boxes filled with nuts or sweets, which the monkeys can fiddle out) and access to natural daylight. A TV screen shall be running in front of the cages during the day. A logbook will be maintained individually for each of the monkeys, carefully monitoring their general appearance, their eating behaviour, weight, and the performance during the training sessions.

### **Acclimatization**

*Discomfort: Mild or none*

The monkeys will be adapted to the animal housing facility and the staff. This includes but is not limited to an initial period in which the animal will be housed with a partner, will receive daily food treats from the staff, and will have access to toys in his cage and television. The total duration of the acclimatization period is approximately three months. Previously acquired monkeys in the facility have successfully undergone this period of adaptation and interact well with the staff and do not exhibit signs of stress due to their environment. During this period the monkey will receive a CT and MRI scan (see below). During one of these procedures the monkey will be fitted with a collar.

### **CT scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

A CT scan is obtained to allow 3D models of the monkey's skull to be constructed. These are used to custom design surgical implants which perfectly fit the skull of the animal. The monkey is anesthetized in its home cage, and then transferred to the CT scanner. The scanning procedure lasts less than 5 minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from anesthesia. The total duration of the procedure is approximately 30 minutes. Occasionally, in the event that an implant comes loose, we may perform a further CT scan to assess the state of the underlying bone.

### **MRI scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

Structural MRI scans are obtained to localize brain structures and plan surgical implants. The monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts approximately 15-20 minutes, after which the monkey is returned to his home-cage, and allowed to recover.

### **Chair training**

*Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.*

The collar will be used to gently pull the monkey into the primate chair. Food and liquid rewards will be used in order to classically condition the monkey to enter the chair. Once learnt, the monkeys usually get into the primate chair voluntarily and rapidly. Once this behaviour is acquired, the animal will initially be rewarded with fruit or fruit juice for sitting quietly in the chair for short periods of time. The head of the monkey is not fixated at this stage. The time spent in the chair will gradually be increased as the animal becomes ever more comfortable and will be adjusted according to the animal's behavioural reaction.

### **Surgery: Head-post implantation**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.*

All surgeries are performed in the purpose-built primate operation room within the primate facility of the **10.2.g** Specialist anaesthetic equipment is available and the surgeries are performed by trained staff.

In order to head fix our monkeys during training; a head-post is attached to the skull. The head-post is custom-designed and 3D printed to fit the skull of the animal. After induction of anaesthesia, an incision is made in the skin, and the skin is gently pulled aside, exposing the area of the skull above the cortex. The head-post is attached and the skin is sutured closed. Analgesics are given during the surgery. The duration of the procedure is approximately 1-2 hours.

At the end of the surgery, the animal is monitored and kept warm while waking up. Additional analgesics are given during the recovery period. Following the surgery, training will be discontinued for at least four weeks so that the animal may recuperate. During this time the head-post will become solidly fixed to the animal's skull as the bone integrates with the implant.

### **Head-fixation training**

*Discomfort: Mild*

The animal will receive food and juice rewards for sitting quietly in the chair with their head fixated via the implanted head-post. The amount of time spent fixated in the chair will increase progressively and will be adapted according to the behavioral reaction of the individual animal. Once the animal quietly sits in the chair with his head fixed for a sufficient period of time (0.5 hours), the animal will begin training on the basic experimental tasks. The discomfort of this procedure is mild for the first one or two times that the animal is fixated, and lower after this.

### **Behavioural training on basic tasks**

*Discomfort: Mild*

To motivate monkeys to perform their task, they are placed on a fluid control regime (described below). During training, the monkey is presented with sensory stimuli and responds with an eye movement and/or hand movement. We use positive reinforcement to train the animals, correct responses are followed by a fluid reward and the animals are allowed to work until satiated. The size of the reward is individually determined and is adapted throughout the training session to ensure that the monkeys remain motivated to work. No negative reinforcement is used, incorrect trials are typically followed by a lack of reward, and in some cases a small 'timeout' (5-10s) may be given. As the monkeys learn the paradigm and their performance increases, we gradually make the task more challenging. Task difficulty is adjusted to ensure that the monkeys are able to obtain enough fluid during the training session. During the training periods, animals are typically in the setup 5 days per week, 1-5 h per day (typical is 2h). Training on the initial tasks typically takes between 2-6 months depending on the monkey. An example of a training task is to have the monkey direct their eye to a very small region of a computer screen for 1s (known as 'fixation'). The difficulty of the task slowly increased by gradually decreasing the size of the area that the animal must fixate upon while slowly increasing the duration of the fixation. At the end of the training period the animal is expected to be able to fixate in a 1° diameter window for at least 400ms and perform delayed saccade-tasks. A saccade is a very rapid eye-movement that monkeys (and humans) make approximately 3 times per second to direct the eyes to objects of interest. In a delayed-saccade task the animal must wait for a 'go' cue (e.g. the fixation dot changes colour) before making his eye movement. Some animals are also trained to make hand-movements during the training period. The duration of this training period varies from 1 to 6 months depending on the aptitude of the monkey. In our experience, all monkeys are able to learn these tasks within 6 months.

### **Controlled fluid uptake**

*Discomfort: Mild*

To motivate the animals to work their access to fluid is controlled. The amount of fluid control is individually determined for each monkey and we always begin by training animals without any fluid control. Most animals require some level of restricted access to fluid to motivate to perform behavioural

tasks, and almost all animals require restricted access to motivate them to work on complex tasks. To obtain enough trials for statistical analysis on complex tasks it is almost always necessary to control access to fluid. Our aim is to allow the animal to drink fluid during performance on the behavioral task until they are satiated. This is achieved by:

- The difficulty of the task is adjusted on each day so that the animal is able to receive fluid at a high rate, motivating him to work for more trials, and drink more fluid in total.
- The rate of fluid delivery is slowly increased during a training session to ensure that the animals drinks throughout the session.
- If the training session has to be aborted, for example due to a technical fault, then the animal receives fluid equivalent to the average intake during a training session.
- We investigate the preferences of each animal for particular rewards e.g. apple juice, different types of fruit syrup, or water, and use a reward that is appealing to the animal

We take a number of measures to prevent dehydration:

- The monkeys always receive a minimum of 100ml of fluid each day. If this amount is not reached during the training session, it is supplemented.
- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 35ml per kilogram metabolic weight per day, this number is based on recommendations by the British N3CR (National Center for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010) and the primate facility of UC Davis (2001). For example, a 10kg animal must receive a minimum of:  $10^{0.75} \times 35 = 197\text{ml}$  of fluid per day, averaged over the previous three days. If this average is not achieved, the animal is supplemented with fluid. This is a minimum amount and our animals typically receive much more fluid than this.
- Fluid intake, both received during training and supplemented in the cage, is logged in an electronic system accessible by researchers, caretakers and inspectors.
- The animal is provided with fruit after the training session, the liquid content of the fruit is not counted towards the minimum amount.
- During breaks in the training schedule of more than two days the monkey receives a full water bottle of at least 700ml, animals over 15kg receive an extra bottle. If the break is two days or less, then the animal receives an amount of fluid equal to what it would typically receive during a training session.
- While the animal is under fluid control the researchers and animal caretakers monitor its appearance and behaviour carefully every day, with checks by the animal caretakers during the weekend. We weigh the monkey before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. We check the monkey for any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes, either increased or reduced activity, dry faeces. If any of these welfare criteria is abnormal, the monkey is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the Animal Welfare Body will be informed so that they can check the animal. These criteria (weight, fluid consumed per day) are logged in an electronic system for each monkey so that the history is accessible.
- The animal receives a non-working period once every 9 weeks (on average over a year). During this period (which lasts a minimum of one week) the animal is not trained and receives a full bottle each day (>700ml).

The British NC3R center investigated in 2010 the use of controlled fluid regimes in brain research with macaque monkeys (Prescott et al., 2010). Their conclusion was that, when a controlled-fluid protocol is carefully applied and monitored, there are no negative consequences for the health of the animal. Follow-up research from the University of Newcastle (Gray et al., 2016) showed that controlled fluid uptake for 7 days per week did not lead to abnormal blood values or signs of dehydration. Our own experience with fluid-controlled monkeys shows that the animals stay in good health. From their general appearance, it is very difficult, if not impossible, to distinguish between monkeys under fluid control and monkeys with ad libitum access to water.

Prescott M.J., Brown V.J., Flecknell P.A., Gaffan D, Garrod K, et al., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of

the NC3Rs. J. Neurosci. Methods 193, 167–88

University of California Davis, 2001. Policy statement: water restriction in rhesus behaviour studies. UC Davis Office of Environmental Health and Safety.

Gray et al., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). eNeuro 3(4).

### **Behavioural training on complex tasks**

*Discomfort: Mild*

In these tasks the animal is required to report his percept. Ultimately, we want to have the animal reporting percepts based on phosphenes induced by micro-stimulation. To simulate this, we will first train the animal to discriminate between different complex objects composed of small spots of light that resemble phosphenes. The monkey reports his percept by making eye-movements to associated targets. For example, we will train the animal that if he sees a 'T' he should make an eye movement to one location whereas if he sees an 'L' he should make a saccade to another location. Behavioural training is performed daily with controlled fluid uptake.

### **Surgery: Electrode array implantation**

*Discomfort: Moderate for 3-4 days, becoming mild for 1 week.*

Once the animals are proficient in the task they will be implanted with arrays of micro-electrodes under general anaesthesia with appropriate analgesia and drugs to prevent brain swelling. After induction of anaesthesia, an incision in the skin will expose the skull. The connector which is used to make an electrical connection with the microelectrodes is first attached to the skull. A craniotomy over visual cortex will then be performed. The dura mater will be incised and reflected to allow for the insertion of the micro-arrays. The micro-arrays consist of small chips (approximately 3-6mm square and 0.2mm thick) with 0.5-2.5mm long electrodes, the exact dimensions may vary depending on the iteration of the prosthesis. Thereafter, the dura mater will be put back in place and sutured, as will be the bone flap that was removed during the craniotomy. The skin will then be sutured shut. The total duration of the procedure is approximately 6-9 hours. Once the incision has healed, only the connector from the arrays is exposed, hence the long-term risk of infection and discomfort is minimal. The animal will be given a one-month recuperation period after this surgery before the commencement of training and recordings.

In some cases, we may split this surgery into two separate surgeries to strengthen the attachment between the connector and the skull. In the first surgery a 3D printed, custom-designed 'baseplate' is implanted containing fixation points for the array connectors. In a second surgery at least 4 weeks later, the arrays are implanted and the connector is simply attached to the baseplate.

### **Microstimulation/Recording sessions**

*Discomfort: Mild*

The microstimulation/recording sessions follow an identical format to a behavioural training session, with the exception that the monkey is connected to the recording/stimulation equipment. Microstimulation does not cause any discomfort. The animal's will perform the same tasks as outlined above, except phosphene-based stimuli will be interleaved with physical stimuli. The duration of each session will be between 1-4 hours. The total duration of the recording sessions will be between 3 months to 1 year, although the implants remain useable after this time-period.

### **Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.*

We design the implants based on the shape of the skull of individual animals, which is assessed by CT, and create them by 3D printing of titanium, which has improved the fit of the implants and the ease of implantation. This procedure has enhanced the stability of the implants and decreased the number of instances of implant failure. Yet, in rare cases an implant (i.e. head-post or electrode array connector) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair

surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem. An individual monkey can undergo a maximum of two restorative surgeries per implant (including head-posts) during the course of these procedures. Repair surgery will always be performed in consultation with the Animal Welfare Body (IvD) and (if necessary) the veterinarian.

#### **Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

Monkeys that have reached the end of the experiment and that will not be re-used in other experiments or euthanized are sometimes kept at the institute because of social bonds that the monkeys have formed with other animals, or because they are particularly social animals that are useful for acclimatizing young animals. It may also be possible to send animals to a primate refuge (see NCad advice "Rehoming of former laboratory animals"). In these cases, the implants are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia. Electrode arrays are left in situ, but the connectors are removed. Recording chambers and head-posts are removed. The skin is resutured over the location of the implant and in our experience the animals recover fully from the procedure.

#### **Annual health-check**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anesthesia).*

Once per year, each animal in our facility is checked by the veterinarian to assess their general health and appearance and to take blood/urine samples for further testing. In this way the long-term health of the animals is closely monitored. The animal is lightly anesthetized during this procedure which takes 10-15 minutes per animal.

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

The statistics in our studies are performed across neurons and behavioural trials, and we implant a large number of electrodes per animal meaning that we can acquire sufficient numbers of neurons with only two animals. Two is the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals and is accepted as the norm in primate research. Although we have good experience with most of our monkeys, some individual circumstances may preclude a monkey from being used for a specific experiment (e.g. if he is not able to learn the behavioural task), or ambiguous results may require measurements in a third animal. In such cases, we will apply to the IvD of the institute for permission to use a third monkey.

### **B. The animals**

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

#### **Species used:**

We will use rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*) in these experiments. All monkeys are obtained from the national primate center, or in exceptional circumstances (i.e. if no animals are available from the center) from a licensed importer. Monkeys are typically acquired aged 3 years or older. Our research involves developing a neuroprosthesis and evaluating its utility for restoration of sight in blind people. The functionality of our device should aid blind people in daily life, such as reading, navigating their environment and recognising objects and facial expressions. Hence, our animals need to have a visual system that is comparable to that of a human and perform cognitively demanding tasks in which they discriminate between complex objects over sustained periods of time, while directing their gaze to a fixation point in the visual field. The visual system of the macaque monkey is organised in a very similar fashion to that of humans. Unlike rodents, monkeys have a foveated retina, they are strongly binocular and their visual sensitivity is very similar to that of humans 10.2.e en 10.2.g

Their primarily visual cortex, like that of humans, is clearly layered and well-organised. Macaques can be trained to discriminate between complex objects and to shift their attention and their eyes to particular locations and objects in the visual scene. Humans and monkeys are the only animals able to perform these kinds of tasks. Rodents and cats cannot be trained on such perceptually demanding tasks in a way that would verify the efficacy of our neuroprosthesis for blind humans. Furthermore, the much smaller size of the rodent visual cortex does not permit the implantation of a

sufficiently sophisticated visual prosthetic interface; neither does the neurobiology of the rodent visual cortex permit the development and testing of our device, due to interspecies differences. At present, our device cannot yet be tested in humans, as the technology is still under development, and requires refinement before translation to human subjects is possible. Hence, the research can only be carried out using awake monkeys. The rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is a commonly used species for this type of research and we will be able to benefit from the existing literature on macaque monkeys, and relate our findings to previous work.

**Sex used:**

We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is highly unlikely that there are differences between the sexes in how micro-stimulation produces phosphenes. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.

**Animal number:**

We expect that at least two animals are necessary in order to obtain reliable results for each iteration of the prosthesis design. When comparable data is obtained from two individuals it can be assumed that the results are not attributable to individual differences. Previous studies have obtained reliable results from two animals, but given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. It could be possible that data from one animal must eventually be excluded from the analysis, contradictory results arise from the first two monkeys, or ethical considerations require the termination of one animal. Such cases require the acquisition of data from a third animal. The acquisition of a third animal for a particular research question will be performed in consultation with the IvD of the institute. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 projects a third monkey was required (22% chance).

The experiments described here are divided into three iterations of the visual prosthesis. Given two animals per iteration, the experiments require a minimum of 6 animals. Given the historical data indicating a 22% chance per project of requiring a third animal, we also request the possibility of adding one extra animal in the case of inconsistent results or problems with one of the animals. We therefore require a maximum of 7 animals. Note that we have already begun the procedures to implant the first iteration of the implant in 2 animals as part of our ongoing DEC protocols (#3, as described in the attached document: 'Overview of DEC protocols currently in progress'). These animals will be brought under this license and will count towards the total number of animals. We therefore require a potential maximum of 5 newly acquired animals.

---

**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.

The electrode arrays implanted in these animals can provide functionally useful signals for periods of several years. After the experiments of this procedure have been completed with these animals they can be retrained to perform other cognitive tasks without any further surgical interventions. In some cases, it may be possible to further implant an animal with an extra array/chamber in the opposite hemisphere. In these cases, the animals will be transferred to the relevant protocol. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives a maximum of two intracranial implants and has not undergone serious discomfort. Re-use is preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals.

---

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**

Our long-term goal is to develop an implantable neuroprosthetic device that restores a limited form of vision to blind people. To accomplish this, we must demonstrate how this technology can be used to generate artificial visual percepts that are useful to humans in daily life. It is not ethical to test this device in human patients without any knowledge of the functioning of the device or the tissue damage that the device could potentially cause, it must therefore first be tested in an animal model. Monkeys are the best option for the development of a visual neuroprosthesis that is intended for human use for the following reasons: 1) We need to implant a large, complex neural interface in the visual cortex, which precludes the use of rodents who have a considerably smaller visual system 2) The tasks required for this study require a species that can recognize and disambiguate complex visual stimuli 3) To train animals on behavioural tasks that involve eye-movements, the study requires awake behaving monkeys. Given these research goals, no alternative to macaque monkeys is available.

**Reduction**

The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. If possible, we will re-use the animals used in this procedure in further experiments leading to a reduction in the total number of animals used. Similarly, if possible we will reuse animal from other procedures/licenses for the studies described here. We estimate the total amount of re-use to be around one half, thus while we require a maximum of 7 animals to answer our research questions, we expect that 2-3 will come from other experiments, these animals could come from the experiments described in 3.4.4.2 or from future CCD approved licenses. Please see the included flow-charts for further details.

**Refinement**

All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, our implants (such as head posts and neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities. Six, all eye-movement measurements are made using video-cameras rather than the more invasive scleral coil technique.

---

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

---

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as needed. Post-surgical analgesics will be administered and animals will be kept on a warm blanket or under a warm lamp until they wake up. Food and fluids are placed in the home cage to facilitate easy access to food and water. They will be allowed to recover for several weeks following surgery. During a recovery period of at least 7 days post-surgery, behaviour, wound area, and appearance will be monitored daily. Animals are monitored in an annual check-up by a veterinarian to ensure they are in good health.

After the recovery period, we constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every day. During periods of behavioural training the animals are weighed daily and all details concerning weight, appearance, fluid intake and any irregularities are recorded in an electronic database which can be viewed by researchers, caretakers and inspectors.

---

## 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.

The proposed experiments are novel and an essential step before constructing a prosthesis to be implanted in blind humans. The applicants are very familiar with the research literature on visual prostheses and the present set of experiments are ground breaking and have not been performed previously. This research is not legally required.

## 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

No

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

Monkeys will be housed solitarily for several days following an implantation surgery, to ensure full rest and recovery. The cage environment will be enriched by bedding material, swings, toys, and treats. We will monitor their weight and appearance on a daily basis.

Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid uptake have been described above.

### 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.

During surgery, anaesthesia and analgesia will be applied as described above. Also post-surgery analgesics will be administered.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Infections: In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of microbial infection will be monitored.

The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: (a) aberrant behaviour; (b) dehydration; (c) weight loss.

2. The occurrence of weight loss due to the controlled fluid uptake and the measures that we take to prevent dehydration have been described above.

3. Insufficient recovery after surgery: applicable if an animal shows permanent weight loss (more than 15%-20% of the weight immediately after surgery for more than 10 days). This occurs infrequently (<2%).

4. Loosening of an implant.

5. Brain swelling during operations.

6. Seizures. In very rare cases it may be possible an animal suffers from a seizure, this may be due to brain-swelling after an operation or a side-effect of an infection.

7. Sub-dural bleeding. During operations or electrode penetrations it can occur that a blood-vessel is damaged. Small bleeds typically cease within minutes with no ill effects. Very rarely the bleed may be larger leading to neurological symptoms. These typically disappear within a few days. In the case of persistent severe neurological symptoms, the animal is euthanized.

---

Explain why these effects may emerge.

Surgical implantation of cranial and brain implants is accompanied by risk of microbial infection, tissue rejection, or unwanted growth of granulation tissue that prevents the implant from integrating with the body. The causes of the other adverse effects are described above.

---

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

1. We constantly monitor the animal's behaviour, liquid intake, wound area, and physiology. Surgeries are performed under sterile conditions and without any unnecessary delays to minimize the amount of time the animal spends under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

2. The measures to prevent dehydration due to controlled fluid uptake have been described above.

3. We monitor animals carefully after surgery. They are placed under heat-lamps during recovery and given post-operative analgesics. Food and water are freely available in the home-cage. The animals are temporarily housed alone after the surgery to allow proper recovery. All animals are checked once per year by the veterinarian to monitor their long-term health.

4. Over the years we have made several refinements to our cranial implants, such as head posts (described above in the section on refinement) and we continuously review and refine the design of our implants. Headposts and all cranial implants are now custom-designed for each monkey and 3D printed to ensure a good fit. This greatly reduces the chances of the implant becoming loose. In the unlikely event that a head post or array connector becomes loose or detached, the animal is closely inspected, and may undergo a CT scan to allow us to assess the condition of the bone. If an implant becomes loose/detached from the skull, we reattach the implant in a repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In rare cases (once in the past 10 years), the skull becomes infected, causing moderate discomfort. In these cases, the monkey is immediately euthanized under anaesthesia. We minimize the occurrence of headpost failures by slowly adapting the monkey to being head-fixed in the set-up so that it is relaxed and does not exert strong forces on the headpost while fixed in the setup.

5. To combat the possibility of brain-swelling, we always give pre-, peri- and post-operative corticosteroids for operations in which the skull is opened and, if indicated, we give intravenous mannitol.

6. If the animal suffers a seizure, anti-seizure medication is given immediately and the underlying cause is treated, e.g. with high-dose corticosteroids or antibiotics. The veterinarian is informed.

7. All operations are performed as precisely as possible by trained staff.

---

## **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.

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The monkey will be monitored for its general appearance and activity level. If a monkey has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, weight loss, reduction in activity level) then we will notify the IvD and evaluate the animal together with the veterinarian. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight in 2 consecutive days then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached.

If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized (this only occurred once in the past 10 years).

Indicate the likely incidence.

Human endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within the time frame of the experiments.

#### **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').

##### **Acclimatization**

*Discomfort: Mild or none*

##### **CT scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

##### **MRI scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

##### **Chair training**

*Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.*

The animal experiences some stress the first one or two times, but they very quickly learn to associate the chair with rewards and voluntarily enter the chair after this phase.

##### **Surgery: Head-post implantation**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.*

##### **Head-fixation training**

*Discomfort: Mild*

Monkeys very quickly adapt to head-fixation.

##### **Behavioural training**

*Discomfort: Mild*

##### **Controlled fluid uptake**

*Discomfort: Mild*

These procedures are classified as mild, given that many measures are taken (described above) to ensure that the monkeys receive their daily fluid requirements.

##### **Surgery: Electrode array and laminar array implantation**

*Discomfort: Moderate for 3-4 days, becoming mild for 1 week.*

In some cases, we may split this surgery into two separate surgeries to strengthen the attachment between the connector and the skull. In the first surgery a 'baseplate' is implanted containing fixation points for the array connectors. In a second surgery, at least 4 weeks later, the arrays are implanted and the connector is simply attached to the baseplate.

##### **Microstimulation/Recording sessions**

*Discomfort: Mild*

##### **Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.*

Restorative surgeries cause considerably less discomfort than the original implantation surgery as there

is no need to cut through the skin and muscle tissue, which have already been removed during the original implantation. Hence, the overall tissue damage is minimal and the animals recover rapidly. The surgery and recovery from surgery is classified as moderate discomfort (for 1-2 days), becoming mild (for 3-4 days). There is a maximum of two restorative surgeries per implant.

**Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

**Annual health check**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

**Cumulative discomfort**

The monkeys in this protocol will experience moderate discomfort for short periods following surgeries. All surgeries are performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. We also ensure that the animals receive long recovery times of at least 4 weeks after implantation surgeries. The animals also experience mild discomfort for longer periods of time related to controlled fluid uptake. We take several measures to maximise the amount of fluid received by the animals and we provide breaks in the controlled fluid uptake regime to keep this discomfort to a minimum. Given these considerations we estimate the cumulative discomfort to be moderate. Animals that enter this project through re-use will already have been trained on complex tasks and will have received one intracranial implant. These animals will receive one extra intracranial implant as part of the experiments described here, involving moderate discomfort. We estimate the cumulative discomfort for re-used animals to be moderate.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The monkey will be euthanized so that we can obtain anatomical data regarding the impact of the prosthesis on the health of the brain. We will examine both macroscopic anatomical changes and microscopic changes using histological techniques. The monkeys will be cardially perfused with fixative under deep barbiturate anaesthesia.

Note that we are primarily interested in the long-term effects (>1 year) of the prosthesis on brain tissue, and therefore the animals may be able to be reused in other experiments prior to being euthanized.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.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'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.2	Intracranial implants and performance on complex tasks

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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 procedures described in this appendix concern investigations into the generation of visual percepts by micro-stimulation in different layers of visual cortex and in different brain areas.**

The primary aim of this application is to develop a visual prosthesis in macaque monkeys that can ultimately be used to restore partial vision to blind human patients. The design of the prosthesis will proceed through at least three iterations. The first iteration is built upon the knowledge we already possess about the generation of visual percepts through micro-stimulation. The purpose of the experiments in this appendix is to answer specific questions about the generation of phosphene-based percepts to improve the design of the second and third iterations of the prosthesis.

These questions are:

- 1) Which layers should be targeted by the electrodes of the prosthesis and is it possible to micro-stimulate specific layers of cortex?
- 2) Is it possible to induce more complex perceptions and to create perceptual grouping of phosphene patterns by micro-stimulating higher visual areas?
- 3) Is it possible to direct attention to some phosphenes while ignoring others and how does this attention process impact on brain areas involved in higher brain areas including those involved in the generation of eye movements?

By answering these questions, we can improve the design of the prosthesis with the aim of producing *complex and stable* phosphene percepts, that form easily recognisable objects, even when embedded in

natural scenes, and that permit the subject to direct their attention to some of the phosphenes and ignore others, just as is possible for the information that enters the eyes of people with intact sight. Monkeys will be trained to report their percepts using an eye-movement, or in some control situations, a hand-movement. The animals will receive intracranial implants which will allow us to monitor neural activity in multiple brain areas while the animal performs the task. We will use 2D 'Utah' arrays, which allow a large coverage of cortex, and/or 3D laminar arrays/electrodes, which allow simultaneous measurements of neural activity at different depths. Alternatively, the animals will receive recording chambers positioned over different visual areas, which will allow us to acutely monitor neural activity in deeper brain structures. In each experiment we will apply micro-stimulation to impose activity patterns, or interfere with ongoing activity.

The primary outcome parameters are:

- i) The behaviour of the animal. The animal will be trained to report complex visual percepts such as letters and shapes and perform tasks allowing us to judge the quality of the phosphene percept.
- ii) Neural activity recorded from the electrodes. All electrode types described here can record single- and multi-unit activity and well as the local field potential. We will examine the link between stimulation of neural tissue, neural activity recorded in different areas of the visual brain and the percept reported by the monkey.

## 10.2.g

The monkeys will be acquired and acclimatized to the primate facility at [redacted]. They will undergo structural anatomical scans to guide the design of the surgical implants. The animals will be implanted with a head-post, which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up. The animals will be placed on a controlled fluid regime and trained on basic tasks such as fixating on small regions of a computer screen and making eye-movements to visual targets. After reaching high levels of performance on these basic tasks the animal will then be trained on more complex visual tasks that require the identification or memorization of complex objects. Once trained on these tasks the animals will be implanted with arrays of microelectrodes and/or laminar electrodes, and/or recording chambers targeting different brain regions. After recovery from the implantation, we will then begin electrophysiological experiments in which we record neural activity from the electrodes while the monkey performs the task. During these experiments we will microstimulate the electrodes, either supra-threshold (to elicit a phosphene or eye-movement) or sub-threshold (to interfere with ongoing processing or probe connectivity between brain regions).

It is also possible that animals which have already taken part in the experiments of Appendix 3.4.4.1 or animals from other CCD approved licenses will be transferred to this protocol. These animals will already have received an intracranial implant as part of the procedures outlined in the other protocol. The term 'intra-cranial implant' refers to the following:

- 1) A set of micro-electrode arrays (2D or 3D) attached to a connector on the skull.
- 2) A recording chamber.

In the majority of animals, no further intracranial implants will be necessary and the animals will only undergo the behavioural training described below. In some cases, and only if necessary for the aims of this procedure, the animal will receive further intracranial implants with the condition that an individual animal can receive a maximum of two intracranial implants in the course of their lifetime. For example, an animal that completes the experiments of Appendix 3.4.4.1 may receive an electrode array implantation. They can then be transferred to Appendix 3.4.4.2 and receive a further implant (e.g. a recording chamber) bringing the total number of intracranial implants to two. Animals may also be transferred to this protocol from other CCD approved licenses in the future. This will only be done under the condition that the animal has not experienced serious discomfort and receives, in total, a maximum of two intracranial implants.

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

The animals of this appendix will undergo the following procedures, which are fully described in Appendix 3.4.4.1

*(See also attached flow charts for more details)*

*Acquisition and housing*

*Acclimatization*

*CT scanning*

*MRI scanning*

*Chair training*

*Surgery: Head-post implantation*

*Head-fixation training*

*Behavioural training on basic tasks*

*Controlled fluid uptake*

*Annual health-check*

The animals of this appendix will undergo the following procedures specific to this appendix:

#### **Behavioural training on complex tasks**

*Discomfort: Mild*

The goal of the animal experiments described here is to understand how micro- or optogenetic stimulation in different layers and brain areas produces particular phosphene patterns. To this end we train the monkeys on tasks in which they are presented with complex stimuli, either through light or phosphene generation, and ask the monkey to report their percept. Examples of such tasks include:

*Curve-tracing:* mentally tracing a curve constructed through small spots of light, or by phosphenes, and making an eye-movement to a target situated at the end of the curve. This task tests how attention spreads through objects in the visual scene.

*Complex figure-ground segregation:* the animal is presented with complex objects, such as letters, which may be defined by textures or phosphenes. The animal's task is to discriminate between different objects. This task is thought to require interactions between high-level visual areas and the primary visual cortex.

*Delayed match-to-position/sample:* monkeys are trained to remember the precise spatial location or shape of a visual object or phosphene pattern and report which one of set of test objects matched the sample. This tests the accuracy of both visual perception and its storage in memory.

The exact tasks will depend on the research question and may evolve on the basis of the results discovered in the early phases of the experiment. In each case the difficulty of the task is slowly increased over days and the presentation of the stimulus is varied along several dimensions (e.g. size and position of the stimulus) to ensure that the monkey can generalise the rule he has learnt.

#### **Implants**

After the monkeys have reached high levels of performance on the complex tasks they will undergo operations to implant a maximum of two of the following intracranial implants.

- A set of 2D Electrode arrays in V1 and a higher visual area (e.g. V4) plus connector(s).
- A set of Laminar (i.e. 3D) electrode arrays in V1 and a higher visual area plus connector(s).
- A recording chamber.

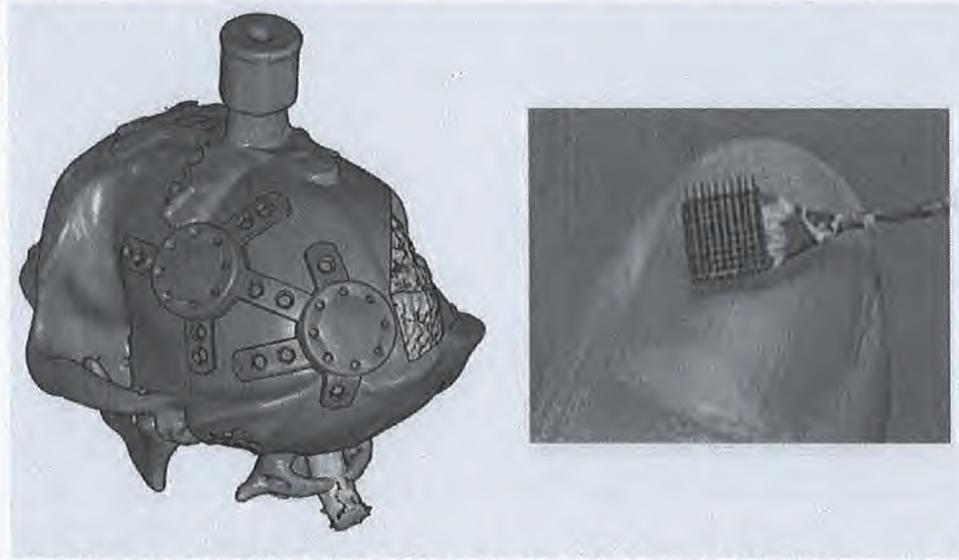
If an animal receives more than one intracranial implant, these will be implanted in separate operations, with a long period in between. Typically, these operations would be more than 6 months apart, with a minimum of at least 2 months. An individual animal can receive a maximum of one head-post and two intracranial implants in its lifetime.

#### **Surgery: Electrode array and laminar array implantation**

*Discomfort: Moderate for 3-4 days, becoming mild for 1 week.*

The surgical procedure for 2D electrode arrays and 3D laminar arrays is identical. Once the animals have reached a sufficient level of performance on the behavioural tasks they are implanted with arrays of micro-electrodes under general anaesthesia with appropriate analgesia and drugs to reduce brain swelling. After induction of anaesthesia, an incision in the skin will expose the skull. The connectors which are used to make an electrical connection with the microelectrodes are first attached to the skull. A craniotomy over visual cortex will then be performed. The dura mater will be incised and reflected to allow for the insertion of the micro-arrays. Thereafter, the dura mater will be put back in place and sutured, as will be the bone flap that was removed during the craniotomy. The skin will then be sutured shut. The total duration of the procedure is approximately 6-9 hours. Once the incision has healed, only the small connectors from the arrays are exposed. Hence the long-term risk of infection and discomfort is minimal. The animal will be given a one-month recuperation period after this surgery before the commencement of training and recordings.

In some cases, we may split this surgery into two separate surgeries. In the first surgery a 3D printed, custom-designed 'baseplate' is implanted containing fixation points for the array connectors (see Figure 3 below). In a second surgery at least 4 weeks later, the arrays are implanted and the connectors are simply attached to the baseplate. This approach has the advantage of reducing the overall time for the implantation surgery and providing a very stable attachment of the connectors to the skull, decreasing the probability of implant failure.



**Figure 3. Baseplate and head-post.** The image to the left shows a 3D reconstruction of the skull (viewed from the left/rear) from a CT scan of a monkey who had been implanted with a head-post several months prior to the CT. The head-post had become very well integrated into the skull, bone-growth over the legs of the head-post is clearly visible in the CT scan. The blue structure is a 3D model of a 'baseplate' which would be used to attach the electrode-array connectors. The CT scan is used to design and place the baseplate. These 3D models are also used to design recording chambers and to plan the craniotomy for an electrode implantation, for example a proposed skull opening has been shown in this image. The image to the right shows the size of a 2D 'Utah' array (10x10 electrodes).

#### **Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy**

*Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.*

A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to perform a craniotomy allowing access to the underlying brain structures. An incision is made in the scalp and the skin is retracted. A small section of skull (~2cm) is removed. A recording chamber is placed around the craniotomy and attached to the

skull, with surgical screws and/or dental cement. Whenever possible the recording chamber will be 3D printed to ensure an excellent fit to the skull and will be made of titanium ensuring good bio-compatibility, strength and low weight. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure. The animal also receives drugs which reduce intracranial pressure during the operation (e.g. mannitol, dexamethasone).

The recording chamber must be cleaned every 2-3 days to prevent infection. The procedure takes place while the animal is sitting in the primate chair before or after a recording session. The chamber lid is removed and the interior of the chamber is flushed with anti-bacterial solutions such as chlorhexidine. Finally, the chamber is flushed with saline. The total duration of the cleaning procedure is around 5 minutes and it causes no discomfort.

### **Recording sessions**

*Discomfort: Mild*

The microstimulation and neural recording sessions follow an identical format to a behavioural training session, with the exception that the monkey is connected to the recording/stimulation equipment. Microstimulation does not cause any discomfort. In experiments with recording chambers the electrode will be moved across the dura and into the brain at the start of each recording session, this causes a brief moment of mild discomfort. The animal's will perform the same tasks as outlined above. The duration of each session will be between 1-5 hours. The total duration of the recording sessions will be between 3 months to 1 year, although the implants remain useable after this time-period.

### **Removing tissue above the dura**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

It is sometimes necessary to remove tissue that has grown over the dura within a recording chamber to improve the ease with which electrodes can be moved into the brain. The monkey is lightly anesthetized and the tissue is removed with a specially designed tool. The amount of tissue damage caused by this procedure is minimal and the monkey recovers within an hour after cessation of the anesthesia. The monkey receives analgesics during the procedure.

### **Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.*

In rare cases an implant (i.e. head-post, electrode array connector or recording chamber) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem. An individual monkey can undergo a maximum of two restorative surgeries per implant (including the head-post) during the course of these procedures. Repair surgery will always be performed in consultation with the Animal Welfare Body (IVD) and (if necessary) the veterinarian.

### **Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

Monkeys that have reached the end of the experiment and that will not be re-used in other experiments are sometimes kept at the institute because of social bonds that the monkeys have formed with other animals, or because they are particularly social animals that are useful for acclimatizing young animals. It may also be possible to send animals to a primate refuge (see NCad advice "Rehoming of former laboratory animals"). In these cases, the implants are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia. Electrode arrays are left in situ, but the connectors are removed. Recording chambers and head-posts are removed. The skin is resutured over the location of the implant and in our experience the animals recover fully from the procedure.

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

The statistics in our studies are performed across neurons and behavioural trials, and we implant a large number of electrodes per animal meaning that we can acquire sufficient numbers of neurons with only two animals. Two is the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals and is accepted as the norm in primate research. Although we have good experience with most of our monkeys, some individual circumstances may preclude a monkey from being used for a specific experiment (e.g. if he is not able to learn the behavioural task), or ambiguous results may require measurements in a third animal. In such cases, we will apply to the IvD of the institute for permission to use a third monkey.

#### **B. The animals**

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

##### **Species used:**

We will use rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*) in these experiments. All monkeys are obtained from a national primate center, or in exceptional circumstances (i.e. if no animals are available from a primate center) from a licensed importer. Monkeys are typically acquired aged 3 years or older. This project investigates processing in the brain using chronically implanted electrodes or recording chambers. Due to the invasive nature of the procedure it is not possible to do the experiments in humans. The tasks that the animals will perform involve maintaining fixation while attending to other locations, as well as remembering the location of visual targets for several seconds and making eye movements to texture-defined objects. These tasks can only be performed by primates. Rhesus monkeys have a neuroanatomy that is highly similar to that of humans and they can be trained to perform complex cognitive tasks. Given the similarity to human neuroanatomical organisation and the existing body of data that is available on psychophysical capacities and neurophysiological responses [10.2.e en 10.2.g](#), the rhesus monkey is the appropriate model for the present study.

##### **Sex used:**

We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is highly unlikely that there are differences between the sexes in how micro-stimulation produces phosphenes. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.

##### **Animal number:**

We expect that at least two animals are necessary in order to obtain reliable results for each experimental question considered. When comparable data is obtained from two individuals it can be assumed that the results are not attributable to individual differences. Previous studies have obtained reliable results from two animals, but given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. It could be possible that data from one animal must eventually be excluded from the analysis, contradictory results arise from the first two monkeys, or ethical considerations require the termination of one animal. Such cases require the acquisition of data from a third animal. The acquisition of a third animal for a particular research question will be performed in consultation with the IvD of the institute. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 projects a third monkey was required (22% chance).

The experiments described here will be used to address three separate research questions:

- 1) Which layers should be targeted by the electrodes of the prosthesis and is it possible to micro-stimulate specific layers of cortex?
- 2) Is it possible to create complex perceptions and figure-ground segregation of phosphene patterns by micro-stimulating higher visual areas?
- 3) Is it possible to direct attention to some phosphenes while ignoring others and how does this attention process impact on brain areas involved in higher brain areas including those involved in the generation of

eye movements?

Given that we typically use two animals per research question we envisage using 6 animals in the course of this proposal. The historical data above indicates a 22% chance per project of requiring a third animal, we therefore also request the possibility of adding one extra animal in the case of inconsistent results or problems with one of the animals. We therefore require a maximum of 7 animals. Note that we have already begun experiments in one monkey examining the effects of micro-stimulating higher visual areas as part of our ongoing DEC protocols (#1, as described in the attached document: 'Overview of DEC protocols currently in progress'). In addition, we have also already begun experiments to examine the neural responses in attentional-control centres to complex objects in two monkeys (DEC protocol #2). These three animals will be brought under this license and will count towards the total number of animals. We therefore require a potential maximum of 4 newly acquired animals. Note that, due to re-use, the actual number of animals used will be lower than this (See attached flow charts for more details).

### 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.

The electrode arrays/recording chambers implanted in these animals can provide functionally useful signals for periods of several years. After the experiments of this procedure have been completed with these animals they can be retrained to perform other cognitive tasks without any further surgical interventions. In some cases, it may be possible to further implant an animal with an extra set of arrays or a recording chamber in the opposite hemisphere. In these cases, the animals will be transferred to the relevant protocol. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives a maximum of two intracranial implants during its lifetime, in addition to a head-post. Re-use is greatly preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals and the total number of surgeries.

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement

The main aims of this application are to develop a visual prosthesis to treat blindness and to obtain the knowledge necessary to do this about the functioning of the visual system. To investigate visual perception we require an animal that can fixate on a small region of a screen and report its percept. The animal must be able to be trained to disambiguate complex visual stimuli such as letters or complex objects and understand cues such as attentional cues and 'go' cues. Only primates such as macaques and humans are able to perform such complex tasks. The experiments are invasive as they require the implantation of a head-post and intracranial implants such as electrode arrays. It is not possible to use non-invasive techniques such as fMRI in humans to investigate these research questions as the temporal resolution of the technique is insufficient to study neural interactions between different areas which occur on the order of milliseconds, and our research questions require measurements of activity on the scale of small groups of cells. Furthermore, it is not possible to non-invasively (transcranially) stimulate the human brain with sufficient spatial specificity to produce patterns of phosphenes. These experiments can therefore not be performed in humans. It would be impossible to develop a suitable prosthesis in an animal with a smaller visual cortex given the space needed to place 1000 electrodes or more. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.

## **Reduction**

The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. We reduce the total number of animals used by training individual animals on multiple tasks so that the data from a single animal contributes to multiple research questions. Furthermore, if possible, we can implant further electrodes/chambers in the other hemisphere after recordings are no longer possible from the original electrodes. This allows us to increase the total number of recordings made and to collect behavioural data on multiple research questions. Similarly, if possible we will reuse animal from other procedures/licenses for the studies described here. We estimate the total amount of re-use to be around one half, thus while we require maximally 7 animals to answer our research questions, we expect that approximately 2-3 will come from other experiments. Please see the included flow-charts for further details. Several of the techniques described below under 'refinement' also contribute to a reduction in animal numbers as they improve the stability of implants allowing sampling of more data so that, if possible, the research question can be answered using data from only two animals.

## **Refinement**

All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, our implants (such as head posts and neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, 3D printed, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities. Six, all eye-movement measurements are made using video-cameras rather than the more invasive scleral coil technique.

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

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Post-surgical analgesics will be administered and animals will be kept on a warm blanket or under a warm lamp until they wake up. Food and fluids are placed in the home cage to facilitate easy access to food and water. They will be allowed to recover for several weeks following surgery. Behaviour, wound area and appearance will be monitored daily for at least 7 days post-surgery.

After the recovery period, we constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every day.

## **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.

The proposed experiments are novel and an essential step before constructing a prosthesis to be implanted in blind humans. The applicants are very familiar with the research literature on visual prostheses and visual perception and the present set of experiments are ground breaking and have not been performed previously. This research is not legally required.

## **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

No

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

Monkeys will be housed solitarily for several days following an implantation surgery, to ensure full rest and recovery. The cage environment will be enriched by bedding material, swings, toys, and treats. We will monitor their weight and appearance on a daily basis.

Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid uptake have been described in Appendix 3.4.4.1.

#### **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.

During surgery, anaesthesia and analgesia will be applied as described above. Also post-surgery analgesics will be administered.

#### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

1. Infections: In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of microbial infection will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: (a) aberrant behaviour; (b) dehydration; (c) weight loss.

2. The occurrence of weight loss due to the controlled fluid uptake and the measures that we take to prevent dehydration have been described above.

3. Insufficient recovery after surgery: applicable if an animal shows permanent weight loss (more than 15%-20% of the weight immediately after surgery for more than 10 days). This occurs infrequently (<2%).

4. Loosening of an implant.

5. Brain swelling during operations.

6. Seizures. In very rare cases it may be possible an animal suffers from a seizure, this may be due to brain-swelling after an operation or a side-effect of an infection.

7. Sub-dural bleeding. During operations or electrode penetrations it can occur that a blood-vessel is

damaged. Small bleeds typically cease within minutes with no ill effects. Very rarely the bleed may be larger leading to neurological symptoms. These typically disappear within a few days. In the case of persistent neurological symptoms, the animal is euthanized.

Explain why these effects may emerge.

Surgical implantation of cranial and brain implants is accompanied by risk of microbial infection, tissue rejection, or unwanted growth of granulation tissue that prevents the implant from integrating with the body. The causes of the other adverse effects are described above.

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

1. We constantly monitor the animal's behaviour, liquid intake, wound area, and physiology. Surgeries are performed under sterile conditions and without any unnecessary delays to minimize the amount of time the animal spends under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).
2. The measures to prevent dehydration due to controlled fluid uptake have been described above.
3. We monitor animals carefully after surgery. They are placed under heat-lamps during recovery and given post-operative analgesics. Food and water are freely available in the home-cage. The animals are temporarily housed alone after the surgery to allow proper recovery. All animals are checked once per year by the veterinarian to monitor their long-term health.
4. Over the years we have made several refinements to our cranial implants, such as head posts (described above in the section on refinement) and we continuously review and refine the design of our implants. Headposts and all cranial implants are now custom-designed for each monkey and 3D printed to ensure a good fit. This greatly reduces the chances of the implant becoming loose. In the unlikely event that a head post or array connector becomes loose or detached, the animal is closely inspected, and may undergo a CT scan to allow us to assess the condition of the bone. If an implant becomes loose/detached from the skull, we reattach the implant in a repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In rare cases (once in the past 10 years), the skull becomes infected, causing moderate discomfort. In these cases, the monkey is immediately euthanized under anaesthesia. We minimize the occurrence of headpost failures by slowly adapting the monkey to being head-fixed in the set-up so that it is relaxed and does not exert strong forces on the headpost while fixed in the setup.
5. To combat the possibility of brain-swelling, we always give pre-, peri- and post-operative corticosteroids for operations in which the skull is opened and, if indicated, we give intravenous mannitol.
6. If the animal suffers a seizure, anti-seizure medication is given immediately and the underlying cause is treated, e.g. with high-dose corticosteroids or antibiotics. The veterinarian is informed.
7. All operations are performed as precisely as possible by trained staff.

#### **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.

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The monkey will be monitored for their general appearance and activity level. If a monkey has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, weight loss, reduction in activity level) then we will notify the Animal Welfare Body and evaluate the animal together with the veterinarian 10.2.g  
Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight in 2 consecutive days then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a

humane endpoint has been reached.

If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized (this only occurred once in the past 10 years).

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience, humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within the time frame of the experiments.

#### **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').

##### **Acclimatization**

*Discomfort: Mild or none*

##### **CT scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

##### **MRI scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

##### **Chair training**

*Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.*

The animal experiences some stress the first one or two times, but they very quickly learn to associate the chair with rewards and voluntary enter the chair after this phase.

##### **Surgery: Head-post implantation**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.*

##### **Head-fixation training**

*Discomfort: Mild*

Monkeys very quickly adapt to head-fixation.

##### **Behavioural training**

*Discomfort: Mild*

##### **Controlled fluid uptake**

*Discomfort: Mild*

These procedures are classified as mild, given that many measures are taken (described above) to ensure that the monkeys receive their daily fluid requirements.

##### **Surgery: Electrode array and laminar array implantation**

*Discomfort: Moderate for 3-4 days, becoming mild for 1 week.*

##### **Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy**

*Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.*

##### **Recording sessions**

*Discomfort: Mild*

##### **Removing tissue above the dura**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

##### **Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.*

Restorative surgeries cause considerably less discomfort than the original implantation surgery as there is no need to cut through the skin and muscle tissue, which have already been removed during the original implantation. Hence, the overall tissue damage is minimal and the animals recover rapidly. The

surgery and recovery from surgery is classified as moderate discomfort (for 1-2 days), becoming mild (for 3-4 days).

**Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

**Annual health check**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

**Cumulative discomfort**

The monkeys in this protocol will experience moderate discomfort for short periods following surgeries. All surgeries are performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. We also ensure that the animals receive long recovery times of at least 4 weeks after implantation surgeries. The animals also experience mild discomfort for longer periods of time related to controlled fluid uptake. We take several measures to maximise the amount of fluid received by the animals and we provide breaks in the controlled fluid uptake regime to keep this discomfort to a minimum. Given these considerations we estimate the cumulative discomfort to be moderate. Animals that enter this project through re-use will already have been trained on complex tasks and will have received at least one intracranial implant. Some of these animals will not require any further implants and will simply be trained on the behavioural tasks, other animals will require one extra intracranial implant as part of the experiments described here, involving moderate discomfort. We estimate the cumulative discomfort for re-used animals to be moderate.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

If histological analysis needs to be performed to verify the location of electrodes, then the monkey will be euthanized at the end of the experiment. The animals are euthanized by an overdose of barbiturates. In cases where the brain will be used for further anatomical or histological studies, the monkeys are cardially perfused with fixative.

In cases where anatomical information is not required, it may be possible for the animals to continue living as normal in their home cage at our primate facility or in a national primate facility, or it may be possible for the animals to be transferred to a primate refuge. In these cases, the surgical implants are removed in a further operation.

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

## Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 10.2.g 2017 1046
2. Titel van het project: Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind
3. Titel van de NTS: Visuele waarneming door directe stimulatie van de hersenschors met als uiteindelijk doel herstel van het gezichtsvermogen voor blinden
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: 10.2.g
  - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e en 10.2.g
  - e-mailadres contactpersoon: 10.2.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 15-03-2017
  - aanvraag compleet: 01-05-2017
  - in vergadering besproken: 23-03-2017 en 20-04-2017
  - anderszins behandeld: niet van toepassing
  - termijnonderbreking(en) van 28-03-2017 tot 12-04-2017 en 21-04-2017 tot 01-05-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: niet van toepassing
  - aanpassing aanvraag: finale herziene versie ontvangen op 18-05-2017
  - advies aan CCD: 19-05-2017
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de IvD 10.2.g

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat*

*het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

8. Eventueel horen van aanvrager:

- Datum: 23-03-2017
- Plaats: 10.2.g
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: de aanvrager
- Gestelde vraag / vragen: de tijdens het horen van de aanvrager mondeling gestelde vragen zijn later tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd zie punt 9
- Verstrek(e) antwoord(en): zie punt vraag 9
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag wel; zie onder vraag 9

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum brief van de DEC: 28-03-2017 en 21-04-2017

*Gestelde vragen 28-04-2017:*

- In het geval van onderzoek met non humane primaten vraagt de wet bijzondere aandacht voor de alternatieven en met name een motivatie waarom het onderzoek niet met andere diersoorten kan worden uitgevoerd (varkens – katten?). De DEC vraagt om deze motivatie in het proposal te geven.
- De te volgen procedure rondom de incorporatie van de DEC protocollen oude stijl moet worden beschreven. Zoals blijkt uit de toelichting van de IvD is het plan om, zodra de vergunning is verkregen, dat de bestaande onderzoeksprotocollen worden ingediend als studieprotocol via de IvD; de huidige stand van zaken (wetenschappelijk en proefdierkundig) zal worden gedeeld met de IvD en de plannen en werkprotocollen zullen ter toetsing worden voorgelegd aan de IvD.
- De doelstelling van het project is onder 3.2 in het proposal zorgvuldig gepresenteerd. De aanvraag wekt wel grote verwachtingen over de haalbaarheid van de stap naar de mens over 5 jaar. In de presentatie was duidelijk dat die ambitie leeft maar in hoeverre heeft het een realistische kans van slagen gezien de onzekerheden die er zijn op technisch en wetenschappelijk terrein? De DEC vraagt om de aanvraag op het punt van de verwachtingen die worden gewekt nog een keer goed door te kijken en een mogelijk te optimistische verwachtingen te nuanceren.
- Wat betreft de waterrestrictie; een andere motivatie om dit te doen is ook om een groot aantal trials per dag te kunnen uitvoeren. Dit argument graag toevoegen.
- Er wordt op verschillende plekken in de aanvraag verwezen naar het boek van Naumann. Uit de verstrekte informatie wordt het niet duidelijk wat er destijds precies is misgegaan; zijn dat medische of technische complicaties of was het hele concept verkeerd? Het gevolg is dat het citeren van het boek al motivatie voor het verrichten van onderzoek in apen niet voldoet laat staan dat het een motivatie is voor het uitvoeren van de voorgestelde proeven in NHP. De DEC vraagt om duidelijker te maken wat de problemen waren die in het boek worden geschetst ende verwijzingen naar het boek te beperken tot de background sectie.
- In de background sectie wil de DEC graag een paragraaf opgenomen zien die de stand van zaken beschrijft op het terrein van andere hersenprotheses. In het bijzonder de stand van zaken rondom cochleaire implantaten lijkt relevant; daar is ondanks een beperkte stimulatie van de auditieve zenuw toch een goed resultaat bereikt. Met de prothese in V1 zal ook maar een beperkt deel van de natuurlijke input kunnen worden bewerkstelligd maar, hoewel niet perfect, dat kan toch voldoende zijn voor een significante verbetering van de kwaliteit van leven van de patiënt. Ook voor andere situaties zijn er in proefdieren al goede resultaten bereikt: snorhaarstimulatie. Een weerslag van de stand van zaken op deze gebieden zal bijdragen aan de motivatie dat het ambitieuze project een grote kans van slagen heeft.
- Op meerdere plaatsen in de wereld wordt onderzoek gedaan om te komen tot visuele protheses. In zijn presentatie noemt de aanvrager het onderzoek op Harvard naar de stimulatie van de thalamus. De DEC acht het van belang dat ook het lopende onderzoek in de rest van de wereld wordt benoemd in de aanvraag en dat het duidelijk is dat de aanpak in het project een unieke aanpak is.
- Aan het einde van de proef wordt de aap gedood en als er een noodzaak is voor histologische analyse wordt de aap geperfuseerd. De DEC is van opvatting dat het beter is om in alle gevallen een histologische analyse uit te voeren omdat deze gegevens kunnen bijdragen aan het verkrijgen van preklinische data die noodzakelijk zijn om de stap naar de mens mogelijk te maken.

- De illustratie in de background sectie van een aap uitgerust met een camera geeft een verkeerde voorstelling van zaken. Graag dit figuur aanpassen aan de situatie in het project.
  - De DEC heeft grote moeite met de experimenten gericht op het uittesten van de optogenetische stimulatie. Deze benadering staat duidelijk nog in de kinderschoenen en er moeten nog veel (bio)technische problemen worden opgelost. Dit deel van het voorstel valt naar opvatting van de DEC buiten het streven om over 5 jaar een bruikbaar implantaat te hebben en het is niet realistisch te verwachten dat bij dit implantaat optogenetica een cruciale rol zal spelen. Het onderzoek naar de mogelijkheden en beperkingen van optogenetische stimulatie is zeker van groot belang en de DEC acht het daarom wenselijk dat dit onderzoek in een aparte vergunning wordt ondergebracht.
  - Een van de uiteindelijke doelen is het verbeteren van de kwaliteit van leven van blinden. Misschien is het goed om een parallel te maken met het resultaat van retina-implantaten. Ondanks een relatief bescheiden verbetering van de visuele waarneming was er toch sprake van een verbetering van de kwaliteit van leven. M.a.w. ook als de visuele schors prothese niet perfect is kan het toch al van betekenis zijn voor de patiënt.
- Datum antwoord: 13-04-2017
- Verstrekt(e) antwoord(en): De aanvrager heeft de herziene aanvraag gecomplementeerd op bovenstaande punten en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd. Het voorstel met de optogenetica proeven is uit de aanvraag verwijderd.

Correspondentie met de aanvrager n.a.v. de bespreking op DEC vergadering 20 april 2017

- Datum brief van de DEC: 21-04-2017

Gestelde vragen:

De antwoorden op de door de DEC gestelde vragen in eerste termijn zijn afdoende met uitzondering van de vragen:

- Het figuur in de background sectie met een aap uitgerust met een camera geeft een verkeerde voorstelling van zaken. Graag dit figuur aanpassen aan de situatie in het project.

Antwoord van aanvrager: We have now explained in the figure legend that the diagram is only to give an impression of the idea of the prosthesis. In reality there is no need to use a camera or blindfold to train the monkeys. We prefer to keep the figure as it is, as it gives an impression of the idea behind the prosthesis.

**1. Reactie DEC:** Deze aanpassing is voor de DEC niet afdoende; het onderschrift is op zich helder maar de illustratie zelf wekt een verkeerde indruk van zaken. De DEC dringt aan om de figuur zelf aan te passen aan de voorgestelde experimenten.

- Aantallen dieren. Als "reserve" wordt een derde dier opgevoerd. Wat is de kans dat dit nodig is? Nu wordt voor elke proef een derde dier gevraagd maar als de kans de noodzaak voor een derde dier laag is dan overvraag je met deze manier van redeneren het aantal dieren. Kan het maximum aantal dieren in de aanvraag niet omlaag worden bijgesteld?

Antwoord van aanvrager: The DEC is correct in stating that the number of animals will certainly be lower than the maximum of 18 (the total number has gone down after the removal of the optogenetic experiments). This is addressed in the first page of the flow-diagram where a number of 8-12 animals is proposed. However – on the basis of the advice of the IvD we decided to state the maximum number of animals that could possibly be required as part of this application.

**2. Reactie DEC:** Dit is geen antwoord op de vraag en derhalve niet afdoende. De DEC ziet graag een analyse van de historische gegevens over de afgelopen jaren om de vraag te beantwoorden hoe vaak een derde aap nodig is gebleken en om welke redenen. Daarbij moet een onderscheid worden gemaakt in wetenschappelijke redenen: niet overeenkomende resultaten tussen aap 1 en 2 en meer technische redenen als een slecht lerend dier, voortijdige beëindiging van de proef door complicaties etc. Dit moet inzicht opleveren in het te verwachten aantal dieren; dat is nu minimaal 12 en maximaal 18. Dat laatste aantal zal naar alle waarschijnlijkheid niet worden gehaald maar het moet inzichtelijk worden wat de kans is op 1-2-3 etc. extra apen.

**3. DEC:** De IvD heeft de DEC geïnformeerd dat er contact is tussen de ethologen van 10.2.g en 10.2.g over de kwaliteit van huisvesting om zo het welzijn van de dieren te verbeteren. De DEC stelt voor om dit te benoemen in de aanvraag. Mochten er nog andere aspecten zijn die van belang zijn

voor het welzijn van de dieren in het bijzonder met betrekking tot de reguliere huisvesting (anders dan al genoemd) dan vraagt de DEC om dit expliciet te melden in de aanvraag.

- Datum antwoord: 01-05-2017
- Verstrek(e) antwoord(en) door onderzoeker:

1. We have changed the figure to accurately reflect the experiments in the proposal.
2. We have examined historical data from the lab over the last 10 years to get an estimate of the likelihood that a third animal is required. In 4 projects a third animal was requested out of a total of 18 projects, giving a probability of 22.2%. In 2 cases this was due to medical problems with one of the monkeys assigned to the protocol. In the other two cases it was due to requiring more neurons for statistical analysis as the data from one animal was of poor quality. We have added a sentence to 3.4.4.1 and 3.4.4.2 stating this probability.
3. We have added this to the application.

- Datum aanvullend antwoord: 17-05-2017

1. We have changed the number of animals from 18 to 14 in accordance with the expected limited need for a third animal in our studies. See above.

De aanvrager heeft de herziene aanvraag gecomplementeerd op bovenstaande punten en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd in de herziene aanvraag. De aanpassingen zijn gezien door alle DEC leden.

De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: wel

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

- 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.*  
Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.  
Nieuwe aanvraag – Zie A4
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.  
Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.  
Alle DEC leden zijn onafhankelijke externe leden.

## 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 als hoofddoelstelling: **Het ontwikkelen van een hersenschorsprothese in apen met als uiteindelijk doel om voldoende kennis te verkrijgen om de eerste tests met de prothesen in blinde mensen te kunnen opstarten.** De prothese zal via drie opeenvolgende iteraties telkens verbeterd worden. De verbeteringen worden gebaseerd op nieuwe kennis verkregen door het uitvoeren van een reeks parallelle experimenten elk gericht op specifieke deelaspecten die van belang zijn voor een goed functionerende en voor de patiënten zinvolle prothese. Deze deelvragen zijn: 1) Kan een elektrische stimulatie van hogere visuele gebieden leiden tot een prothesebeeld dat gebruikt kan worden als een interpreteerbaar complex percept? 2) Kan de stimulatie van verschillende lagen van de visuele cortex de kwaliteit van de opgewekte fosfenen verbeteren? 3) Is het mogelijk om de aandacht te richten op sommige fosfenen en andere te negeren?

De DEC komt tot de conclusie dat de opbouw van de aanvraag overeen komt met voorbeeld 1 van de handreiking 'Invulling definitie project'. De proeven voor de opeenvolgende iteraties en subdoelen vertonen een logische tijds- en uitkomstafhankelijke opeenvolging en zijn verbonden door go/no go momenten bepaald door de kennis verkregen uit de parallelle reeks experimenten. Gezamenlijk leidt dit uiteindelijk tot het bereiken van het hoofddoel.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. 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 dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

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). Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.
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 sluit aan bij de hoofddoelstelling.

### **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 *doel* van het project is het ontwikkelen van een hersenschorsprothese in resusapen met als uiteindelijk doel om voldoende kennis te hebben om de eerste tests met de prothesen in blinde mensen te kunnen opstarten. Het gaat hierbij specifiek om patiënten die geen functioneel netvlies meer hebben of waarbij de verbinding van het netvlies met het brein verloren is gegaan (w.o. glaucoompatiënten). Dit betreft een grote groep patiënten met een dusdanig ernstige beperking dat er sprake is van een aantasting van de kwaliteit van leven. Het gaat hierbij om patiënten die voorheen een normaal gezichtsvermogen hadden en niet om patiënten die blind geboren zijn. Voor de doelgroep waar het in dit project om gaat is een netvliesprothese geen oplossing.

De DEC is ervan overtuigd dat het directe doel van het project gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is wat betreft de technologische mogelijkheden en wat de huidige biologische kennis is. De aanvrager heeft in zijn presentatie uiteengezet dat er duidelijke overeenkomsten zijn tussen visuele hersenschorsprothesen en de cochleaire prothesen die met succes worden toegepast in een klinische setting. Er is geschetst wat de bijdrage van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep, eveneens op apen, is geweest, en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld naar verwachting zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de fundamenteel wetenschappelijke kennis over het ontwikkelen van een hersenschorsprothese in apen nog onvoldoende is om op dit moment al te kunnen overgaan tot toepassing in de mens. Deels is dit een gebrek aan technologische kennis: verdragen de hersenen een geïmplanteerde array gedurende een langere tijd zonder complicaties en blijft het langdurig mogelijk om met de array elektrisch opgewekte beelden te genereren? Deels is het een gebrek aan wetenschappelijke kennis: wat is de complexiteit van de opgewekte beelden, wat is de interactie tussen de verschillende visuele gebieden tijdens de interpretatie van het prothesebeeld en tijdens normale waarneming, hoe wordt het prothesebeeld of een visueel beeld omgezet in een doelgerichte (oog)beweging (fungerend als uitlees parameter voor het waarnemingsvermogen van het dier) en is het mogelijk om de aandacht te richten op sommige aspecten van het prothesebeeld?

Het directe wetenschappelijke belang van de resultaten is dat de nieuw verworven fundamenteel wetenschappelijke kennis zal bijdragen aan nieuwe inzichten in de verwerking van visuele input door het brein. De resultaten zullen ook van groot belang zijn binnen het veld van de oogheelkunde. Daarnaast kunnen de resultaten bijdragen aan het op termijn realiseren van andere typen hersenimplantaten gericht op herstel en/of verbetering van hersenfuncties.

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 onderzoeksproject zijn: De maximaal 14 resusapen. De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door de gevangenschap zullen de dieren geen natuurlijk (groeps)gedrag kunnen ontplooiën zoals onder meer natuurlijke omstandigheden. De dieren zullen matig ongerief ondervinden ten gevolge van meerdere chirurgische ingrepen die ze in de loop van de proef zullen ondergaan. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. Na afloop van de proef zullen de dieren in de meeste

gevallen worden gedood. De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers. Zij zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Onderzoekers in veld van de neurobiologie en oogheelkunde. Dit onderzoek kent een duidelijke fundamenteel-wetenschappelijke component en de te verwachte toename van de kennis over het ontwikkelen en toepassing van visuele protheses zal worden gedeeld door publicaties. De wetenschappelijke resultaten zijn van algemeen belang om de werking van het brein beter te begrijpen en in het bijzonder hoe visuele stimuli worden verwerkt door het brein. De doelgroepen in de maatschappij. Dit onderzoek zal na voltooiing een realistische kans bieden aan de eerste patiënten om een deel van hun gezichtsvermogen terug te kunnen krijgen. Dit zal ertoe leiden dat de kwaliteit van leven voor deze patiënten zal verbeteren.

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

Nee

### **Proefopzet en haalbaarheid**

6. 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*).

De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De voorstellen bouwen voort op de ruime kennis en ervaring die is verkregen door de uitvoering van technisch sterk vergelijkbare experimenten met resusapen binnen de groep.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

7. 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 van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. De keuze van de te gebruiken modellen, de keuze voor de resusaap als proefdier en de indeling in de twee verschillende Type Dierproeven is duidelijk en goed onderbouwd. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zal leiden tot een prothese die over 5 jaar getest kan worden in de mens.

Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden. Dit is inclusief de dieren die op dit moment al worden gebruikt bij proeven die door de DEC onder de oude Wod zijn goedgekeurd. Deze proeven zullen door de IvD worden getoetst of ze inderdaad passen binnen het kader van deze aanvraag, de wetenschappelijke opzet wordt bezien en er wordt bekeken of de ongeriefsaspecten overeenkomen met het in de aanvraag geschatte ongerief.

### **Welzijn dieren**

- 8.** 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*).

- 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)

De doelstellingen van het project vallen binnen de voorwaarden die door de Wod aan het gebruik van niet-menselijke primaten worden verbonden. De keuze voor de resusaap als proefdier is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die als "lager" worden gekenschetst dan de niet-humane primaten zijn niet geschikt door de complexiteit van de benodigde visuele gedragstaken (rapportage van een waargenomen percept opgewekt met elektrische stimulatie). Knaagdieren hebben geen fovea, een gezichtsvermogen met een lage resolutie en de visuele cortex kent minder lagen en kolommen. Voor muizen en ratten geldt daarnaast dat de grootte van de hersenen onvoldoende is voor de te implanteren arrays. Bovendien is de anatomische overeenkomst tussen het visuele systeem van niet-humane primaten en mensen groot zodat de verkregen gegevens goed extrapoleerbaar zijn naar de mens.

Er bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen. Daarnaast zijn de gegevens uit het vooronderzoek verkregen in resusapen en biedt de continuering van het onderzoek met resusapen een grotere kans op het behalen van de doelstellingen.

De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de enige geschikte diersoort is.

- 9.** 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 dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De onderzoeksgroep doet veel moeite om de dieren sociaal te huisvesten en een verrijkte omgeving te bieden. Er is contact met een etholoog die adviezen geeft om een optimale selectie te maken voor de gepaarde huisvesting van de dieren en om de huisvestingcondities te optimaliseren.
- 10.** 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*).

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. De onderzoekers hebben veel ervaring met dit onderzoek en zijn voortdurend op zoek naar verbeteringen in huisvesting, chirurgische methoden en proefopzet om het ongerief te verminderen.

Het cumulatieve ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig. De DEC onderkent dat de classificering van het cumulatieve ongerief voor dit type dierproeven niet eenvoudig is. De proeven duren lang (tot 4 jaar) en de dieren ondergaan in die periode verschillende chirurgische ingrepen met telkens maximaal 3-4 dagen matig ongerief en daarnaast verschillende langere periodes waarin de aap gedragstaken moet uitvoeren onder milde druk van waterrestrictie (mild ongerief).

Het lijkt aannemelijk dat niet-humane primaten, met hun hoge sociale intelligentie, sterk reageren en anticiperen op terugkerende momenten van ongerief die zich gedurende een lange periode in hun leven voordoen. Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard in bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de uitvoering van de gedragstaken. Bij het gebruik van andere diersoorten is het onwaarschijnlijk dat een dergelijke situatie zal kunnen worden gecreëerd en bij het gebruik van bijvoorbeeld honden, katten of varkens zou er eerder sprake zijn van ernstig ongerief.

Alles overwegende komt de DEC tot het oordeel dat een inschatting "cumulatief matig ongerief" op zich een goede weergave is van het ongerief in het licht van wat er in de Wet op de dierproeven bedoeld wordt met de term "ongerief".

Dit alles neemt niet weg dat de DEC oog heeft voor het feit dat het zeer langdurige experimenten betreft, waarin de dieren gedurende langere periodes dagelijks worden ingezet in experimenten waarin zij met hun hoofd worden vastgezet, dorstgevoelens hebben en taken moeten verrichten waarmee zij vloeistof kunnen verdienen. Wellicht wennen zij hieraan en ervaren ze het – na die gewenning – niet als ongerief, maar feit is dat de dieren jarenlang in gevangenschap leven en hun leven volledig in het teken staat van deze experimenten. Het betreft dieren die zowel sociaal als psychologisch zeer complex zijn en dit stelt hoge eisen aan de omgeving en de sociale verbanden waarin de dieren leven. Er wordt weliswaar een reeks maatregelen genomen om de dieren een verrijkt leven te bieden maar dit is geen volwaardige vervanging voor een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. Het is echter lastig om te bepalen welke voor de dieren belangrijke natuurlijke gedragskenmerken ze worden ontzegd door de huisvesting en de experimenten en het is daarom moeilijk te bepalen in welke mate dit tot een aantasting van het welzijn en de integriteit van de dieren leidt.

In het kader van het onderzoek naar de functie van de verschillende iteraties van de prothese zullen de dieren worden gedood om zo inzicht te krijgen naar de lange termijneffecten van de geïmplanteerde arrays op het hersenweefsel zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1. Deze ex vivo analyse verschaft belangrijke informatie over de lange termijn effecten en veiligheidsrisico's bij toekomstige implantatie in de mens. In het kader van het onderzoek naar het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten om de opeenvolgende protheses te verbeteren (bijlage 3.4.4.2) is het doden van het dier

noodzakelijk als ex vivo de posities van de implantaten nauwkeurig moet worden bepaald. Blijft een naar verwachting klein aantal dieren waarvoor deze noodzakelijkheid niet aanwezig is en voor deze dieren zullen de mogelijkheden worden overwogen om ze blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum (zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>). De DEC wijst erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing beperkt zijn, een extra chirurgische ingreep vereisen, en het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier (de DEC signaleert m.b.t. de herplaatsing een dilemma). De DEC adviseert dat voor wat betreft de besluitvorming rondom een eventuele herplaatsing wordt verwezen naar genoemd NCad document (i.h.b. pagina 42-45). In het kort; de *vergunninghouder* besluit, geadviseerd door de IvD.

- 11.** 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 de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door het leven in gevangenschap zullen de dieren zich niet kunnen ontplooiën zoals in een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. De dieren worden weliswaar paarsgewijs gehuisvest, dit is een belangrijke verbetering t.o.v. solitaire huisvesting, maar het stelt de resusapen niet in staat om een normale sociale groepsstructuur te vormen. Ook met de talrijke "verrijkingen" die de dieren worden verstrekt, kan niet volledig worden voldaan aan hun sociale en psychische behoeften. Prikkel en omstandigheden waaraan de dieren in natuurlijke omstandigheden voldoening of welzijn zouden ontleenen worden zoveel mogelijk nagebootst of vervangen door andere prikkels en omstandigheden waarvan men aanneemt dat die een vergelijkbaar effect zullen hebben. Feit blijft echter dat het om een kunstmatige omgeving gaat waarin men onvermijdelijk op beperkingen stuit. Er worden de dieren ervaringen die hen voldoening en plezier geven onthouden (zie ook C10). Ten behoeve van de experimenten worden diverse implantaten in en op het hoofd aangebracht. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. Na afloop van de proef zullen de dieren merendeels worden gedood.

- 12.** 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*).

De humane eindpunten zijn voor elk van de bijlagen dierproeven duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken; dit op basis van ervaring. De aanvrager zal gedurende de gehele uitvoering van de proef het welzijn nauwgezet monitoren. De DEC is daarom van mening dat de aanvrager, indien de dieren toch een humaan eindpunt bereiken, tijdig in kan grijpen om onnodig lijden te voorkomen.

### 3V's

- 13.** 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 DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. De stand van zaken in dit veld is nog niet zover dat de eerste stappen in patiënten gezet kunnen worden. De benodigde kennis is niet aanwezig en de veiligheidsrisico's van het implanteren van grote arrays in de visuele

cortex zijn deels onbekend. Ook is nog niet duidelijk of de protheses wel zullen resulteren in een verbeterd gezichtsvermogen omdat de wetenschappelijke kennis over hoe de verschillende hersengebieden met elkaar samenwerken en hoe een visueel beeld wordt omgezet in een doelgerichte oogbeweging nog ontbreekt. Voor het bereiken van dit doel is het alleen incidenteel mogelijk gebruik te maken van geïmplanteerde elektroden in epilepsiepatiënten waarbij de mogelijkheden voor het verrichten van metingen beperkt is. Het gebruik van gezonde vrijwilligers stuit op ethische bezwaren. Niet invasieve methodes zijn niet bruikbaar.

Zoals gemotiveerd onder C7 is de DEC tot de conclusie gekomen dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de enige geschikte diersoort is.

- 14. 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).**

De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De aanvrager verwacht dat voor iedere proef twee dieren nodig zijn; dit aantal ( $n=2$ ) is gangbaar binnen in dit wetenschappelijke veld. Het totaal aantal dieren is gebaseerd op twee dieren per proef; de criteria voor het gebruik van een derde dier binnen een proef zijn duidelijk beschreven in de aanvraag. De aanvrager heeft op verzoek van de DEC informatie verschaft hoe groot de kans is dat het gebruik van een derde dier noodzakelijk zal blijken te zijn. Op basis van eigen ervaring wordt die kans op 22% geschat. De DEC onderschrijft de verwachting dat voor twee van de zes proeven een derde dier noodzakelijk zal blijken en dat daarmee het aantal dieren op maximaal 14 komt.

De DEC concludeert dat het totaal aantal dieren daarom waarschijnlijk op 14 dieren zal uitkomen. Gegeven de door de verantwoordelijke onderzoeker verstrekte informatie over de kans op de noodzaak van een derde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum aantal van 6 experimenten waarvan er 4 met twee dieren zullen worden uitgevoerd en 2 experiment met 3 dieren; dit komt overeen met 33% kans op een derde dier. In het geval de noodzaak ontstaat om voor meer dan twee experimenten een derde dier te vragen is een wijziging noodzakelijk.

Naar de mening van de DEC zijn de randvoorwaarden voldoende duidelijk beschreven om de IvD in staat te stellen de noodzaak van een derde dier binnen maximaal 2 van de 6 geplande experimenten te kunnen beoordelen.

Door de gefaseerde aanpak van het project wordt optimaal gebruik gemaakt van de proefdieren. Het gebruik van de contralaterale hersenhelft voor andere proeven verhoogt het ongerief voor het individuele dier maar het vermindert het totaal aantal benodigde dieren (zie dilemma)

- 15. 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 heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De dieren worden geleidelijk blootgesteld aan nieuwe aspecten van de uitvoering van de gedragstaken. Een nauwgezette registratie van de hoeveelheid gedronken water vindt plaats om zo uitdroging en schade op de langere termijn te voorkomen. De chirurgische ingrepen worden door ervaren personeel uitgevoerd. De implantaten worden aangepast aan de individuele dieren zodat het de kans op complicaties wordt vermindert. De verwachting is dat humane eindpunten, dus om

redenen van lijden van het dier, zelden zullen worden bereikt.

- 16.** 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.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Naar verwachting zullen de meeste dieren in proef na afloop worden gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt. Zie voor details onder C10 en C18.

- 17.** 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*).

De aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan vrouwen. Het gebruik van beide geslachten beperkt de mogelijkheden om ideale duo's te vormen voor de huisvesting hetgeen van groot belang is voor het welzijn van de dieren.

- 18.** 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*).

In het kader van het onderzoek naar de functie van de verschillende iteraties van de prothese zullen de dieren worden gedood om zo inzicht te krijgen naar de lange termijneffecten van de geïmplanteerde arrays op het hersenweefsel zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1. Deze ex vivo analyse verschaft belangrijke informatie over de lange termijn effecten en veiligheidsrisico's bij toekomstige implantatie in de mens. In het kader van het onderzoek naar het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten om de opeenvolgende protheses te verbeteren (Bijlage 3.4.4.2) is het doden van het dier noodzakelijk als ex vivo de posities van de implantaten nauwkeurig moet worden bepaald. Blijft een, naar verwachting, klein aantal dieren waarvoor deze noodzakelijkheid niet aanwezig is en voor deze dieren zullen de mogelijkheden worden overwogen om ze blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum. Zie ook C10.

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.

In die gevallen waar anatomische informatie niet is vereist is het mogelijk dat een dier blijvend wordt gehuisvest in de primatenfaciliteit of dat het dier naar een apenopvang wordt overgebracht. De mogelijkheden hiertoe zijn uiterst beperkt en het dier zal een extra ingreep moeten ondergaan om de implantaten te verwijderen.

**NTS**

- 19.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en

begrijpelijk geformuleerd?

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

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).  
Rechtvaardigt het ontwikkelen van een hersenschorsprothese om zo voldoende kennis te hebben om de eerste tests met de prothesen in blinde mensen te kunnen opstarten het cumulatieve matige ongerief dat maximaal 14 resusapen wordt aangedaan in het voorliggende project de subdoelen daarbij in aanmerking nemend?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5):

Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: *maximaal matig nadeel*. Dit nadeel bestaat uit meerder periodes van matig ongerief ten gevolge van het uitvoeren van de proef en uit langere periodes van licht ongerief door de uitvoering van complexe visuele gedragstaken. De dieren zullen onder de gegeven huisvestingscondities, ondanks de uitgebreide reeks maatregelen om het welzijn te verbeteren, niet hun gehele repertoire aan natuurlijk groepsgedrag tot uiting kunnen brengen.

Waarden/belangen van de onderzoekers: *veel voordeel*. Deze belangen bestaan voornamelijk uit het verbeteren van hun positie in het betrokken wetenschappelijke veld. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht voor de ethische afweging.

Waarden/belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie en de oogheelkunde: *veel voordeel*. De huidige kennis over de mogelijkheden van array implantaten om tot verbetering van gezichtsvermogen te komen is beperkt. Het voorgenomen project zal unieke gegevens genereren die inzichten geven voor de mogelijkheden van een prothese in de mens en er zal naar verwachting beter inzicht worden verkregen in de processen betrokken bij de verwerking van visuele stimuli.

Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, *andere wetenschapsgebieden*): *veel voordeel*. De aanpak biedt een reële mogelijkheid om een functionele prothese voor patiënten te ontwikkelen. Dit zal voor hen resulteren in een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven. Op dit moment zijn zowel de voordelen en de risico's in de vorm van ernstige complicaties voor de patiënten nog niet helder. De dierexperimenten zijn een essentiële stap om duidelijkheid te krijgen op deze punten zodat de eerste stap naar het toepassen van de prothese op mensen een ethisch verantwoorde stap is.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren

(C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:

- Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename de technische en fundamenteel wetenschappelijke kennis die noodzakelijk is om de eerste trials in patiënten op een ethisch verantwoorde manier mogelijk te maken. De experimenten op niet-humane primaten zijn naar opvatting van de DEC de enige manier om uiteindelijk te komen tot een bruikbare prothese voor blinden.
- De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, beperkt blijft tot maximaal matig ongerief. Zie voor een uitgebreide motivatie onderdeel C10.
- De DEC is er van overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis. Verschillende subsidiegevers steunen het project.
- De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.
- De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen voor maximaal 14 dieren.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: Gegeven de informatie over de kans op de noodzaak van een derde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een

maximum van 14 dieren die het mogelijk maken 6 experimenten uit te voeren waarvan 4 experimenten met twee dieren en 2 experimenten met 3 dieren; dit komt overeen met 33% kans. In het geval de noodzaak ontstaat om voor meer experimenten een derde dier te vragen is een wijziging noodzakelijk. Een plan van aanpak over te leggen aan de CCD met betrekking tot die apen die niet worden gedood in verband met het noodzakelijke onderzoek naar de plaatsing van de array en eventuele schadelijke bijeffecten aan de hersenen.

- 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 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 advies is unaniem.
- 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*). De DEC heeft een aantal dilemma's gesignaleerd die binnen of buiten de context van het project vallen.

Tijdens de uitvoering van de proef zullen de dieren nadat de proeven zijn voltooid opnieuw worden gebruikt voor vervolggexperimenten waarbij de dieren opnieuw moeten worden geopereerd. Het voordeel is dat het aantal dieren hierdoor met de helft zal verminderen. Het nadeel is dat het ongerief voor een individueel dier zal toenemen maar dat een extra periode van gewenning aan de faciliteit en trainingsprocedures wordt voorkomen. De DEC volgt de motivering van de aanvragers m.b.t. het gebruik van een dier voor vervolggexperimenten maar omdat het ongerief van het individuele dier groter wordt is het ook denkbaar dat het gebruik van meer dieren te prefereren is.

De inschatting van het cumulatieve ongerief is bij proeven met resusapen van een duur tot wel 4 jaar is niet eenduidig. Binnen de 4 jaar zijn er meerdere korte periodes van matig ongerief ten voornamelijk als gevolg van de chirurgische ingrepen. De ingrepen vinden plaats onder anesthesie en met pijnbestrijding en het matige ongerief wordt daarom voornamelijk veroorzaakt door desoriëntatie na het bijkomen uit de verdoving. Het interval tussen de ingrepen is dusdanig dat de dieren volledig herstellen. De DEC en de aanvrager schatten het cumulatief ongerief in als matig (zoals gemotiveerd in het advies); echter de volledige lijst van alle ingrepen en de langdurige gedragstaken over 4 jaar is dusdanig lang dat dat de effecten ervan op het dier niet met zekerheid zijn te voorspellen en dat dus niet valt uit te sluiten dat er onder omstandigheden toch ook ernstig cumulatief ongerief kan optreden.

De DEC heeft geconstateerd dat na afloop van de proeven beschreven in bijlage 3.4.4.2 er een aantal dieren zal zijn waarvoor geen wetenschappelijke noodzaak bestaat ze te doden. Deze dieren komen voor herplaatsing in aanmerking omdat voldaan lijkt te zijn aan de voorwaarden genoemd in artikel 13d van de Wod (de gezondheidstoestand van het dier herplaatsing toelaat; (b) er geen gevaar bestaat voor de volksgezondheid, de diergezondheid of het milieu; en (c) passende maatregelen genomen zijn om het welzijn van het dier te waarborgen). De verantwoordelijk onderzoeker stelt in de bijlage dat de mogelijkheden zullen worden overwogen om het dier blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum (zie het NCad advies: Herplaatsing proefdieren). De

verantwoordelijkheid rondom de besluitvorming is beschreven in het NCad document en biedt voldoende waarborgen voor een zorgvuldige besluitvorming. In de besluitvorming zal worden betrokken dat herplaatsing een extra chirurgische ingreep vereist en dat het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier. De afweging of dit extra ongerief gerechtvaardigd is t.o.v. de voordelen van herplaatsing zal een dilemma zijn. Verder wijst de DEC erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing in een apenopvang en het nationaal primaten centrum echter beperkt zijn. Dit kan leiden tot het besluit tot doden van een dier hoewel het in principe geschikt is voor herplaatsing. De DEC vraagt aandacht voor dit probleem.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g  
10.2.e en 10.2.g

10.2.g

**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  
10.2.g 20171046  
**Bijlagen**  
2

**Datum** 2 juni 2017  
**Betreft** Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Geachte** 10.2.e en 10.2.g

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 juni 2017. Het gaat om uw project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is 10.2.g 20171046. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

2 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

10.2.g 20171046

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
2 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
10.2.g 20171046

**Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer:

Postbus:

Postcode en plaats:

IBAN:

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer:

10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

Gegevens verantwoordelijke

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

**Datum:**  
2 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
10.2.g 20171046

**Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker**

**Naam:** 10.2.e en 10.2.g  
**Functie:** 10.2.e en 10.2.g  
**Afdeling:** 10.2.e en 10.2.g  
**Telefoonnummer:**  
**E-mailadres:**

**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 juli 2017  
**Geplande einddatum:** 1 juli 2022  
**Titel project:** Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind  
**Titel niet-technische samenvatting:** Visuele waarneming door directe stimulatie van de hersenschors met als uiteindelijk doel herstel van het gezichtsvermogen voor blinden.

**Naam DEC:**  
**Postadres DEC:**  
**E-mailadres DEC:**

10.2.g

**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:

Plaats:

Datum:

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

1 juni 2017

**Datum:**

2 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

10.2.g 20171046



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g  
10.2.e en 10.2.g  
**10.2.g**

**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  
10.2.g 20171046  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 juni 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 2 juni 2017  
Vervaldatum: 2 juli 2017  
Factuurnummer: 171046

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag 10.2.g 20171046	€ 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.



07 JUNI 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10.2.g <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 10.2.g Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde 10.2.e en 10.2.g KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer
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>	10.2.g 10.2.g
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 10.2.e en 10.2.g <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie 10.2.e en 10.2.g Afdeling 10.2.e en 10.2.g Telefoonnummer 10.2.e en 10.2.g E-mailadres
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 10.2.e en 10.2.g <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie 10.2.e en 10.2.g Afdeling 10.2.e en 10.2.g Telefoonnummer 10.2.e en 10.2.g E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters

Dhr.  Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

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

Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

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

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

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

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

Nee > Ga verder met vraag 3

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

Nee > Ga verder met vraag 3

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

## 3 Over uw project

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

Startdatum 01 - 07 - 2017

Einddatum 01 - 07 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind.

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

Visuele waarneming door directe stimulatie van de hersenschors met als uiteindelijk doel herstel van het gezichtsvermogen voor blinden.

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

Naam DEC

Postadres

E-mailadres

10.2.g

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege  
 Wijziging € Lege
- 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
- Appendices 2 stuks; bijlage DEC protocollen; bijlage Approaches to treating blindness

## 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

10.2.e en 10.2.g

Functie

Plaats

10.2.g

Datum

01 - 06 - 2017

Handtekening

10.2.e en 10.2.g



Datum 31-08-2017  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven  
AVD20171046

## Advies aan CCD

Instelling:

10.2.g

B

Onderzoeker:

10.2.e en 10.2.g

Project:

Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind

Aanvraagnummer:

AVD20171046

Betreft:

Nieuwe aanvraag

Categoriën:

Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	Er zijn geen bijzonderheden geweest in het proces.
--------	--

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		7	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn <b>Niet menselijke primaten</b>
<b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		7	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn <b>Niet menselijke primaten</b>

CITAAT.

Monkeys will be housed solitarily for several days following an implantation surgery, to ensure full rest and recovery. The cage environment will be enriched by bedding material, swings, toys, and treats. We will monitor their weight and appearance on a daily basis.

Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid uptake have been described in Appendix 3.4.4.1.

#### **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**

- 3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks / Rhesusapen (Macaca mulatta): CITAAT. We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is highly unlikely that there are differences between the sexes in how micro-stimulation produces phosphenes. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.
- 3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks / Rhesusapen (Macaca mulatta): Zie 3.4.4.1

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Er worden niet-humane primaten gebruikt in dit project.

#### **2 DEC advies**

<b>DEC-advies</b>	CITAAT. -De doelstellingen van het project vallen binnen de voorwaarden die door
-------------------	---

de Wod aan het gebruik van niet-menselijke primaten worden verbonden. De keuze voor de resusaap als proefdier is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die als "lager" worden gekenschetst dan de niet-humane primaten zijn niet geschikt door de complexiteit van de benodigde visuele gedragstaken (rapportage van een waargenomen percept opgewekt met elektrische stimulatie). Knaagdieren hebben geen fovea, een gezichtsvermogen met een lage resolutie en de visuele cortex kent minder lagen en kolommen. Voor muizen en ratten geldt daarnaast dat de grootte van de hersenen onvoldoende is voor de te implanteren arrays. Bovendien is de anatomische overeenkomst tussen het visuele systeem van niet-humane primaten en mensen groot zodat de verkregen gegevens goed extrapoleerbaar zijn naar de mens.

Er bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen.

Daarnaast zijn de gegevens uit het vooronderzoek verkregen in resusapen en biedt de continuering van het onderzoek met resusapen een grotere kans op het behalen van de doelstellingen.

De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de enige geschikte diersoort is.

-Het cumulatieve ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig.

De DEC onderkent dat de classificering van het cumulatieve ongerief voor dit type dierproeven niet eenvoudig is. De proeven duren lang (tot 4 jaar) en de dieren ondergaan in die periode verschillende chirurgische ingrepen met telkens maximaal 3-4 dagen matig ongerief en daarnaast verschillende langere periodes waarin de aap gedragstaken moet uitvoeren onder milde druk van waterrestrictie (mild ongerief).

Het lijkt aannemelijk dat niet-humane primaten, met hun hoge sociale intelligentie, sterk reageren en anticiperen op terugkerende momenten van ongerief die zich gedurende een lange periode in hun leven voordoen. Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard in bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de

uitvoering van de gedragstaken. Bij het gebruik van andere diersoorten is het onwaarschijnlijk dat een dergelijke situatie zal kunnen worden gecreëerd en bij het gebruik van bijvoorbeeld honden, katten of varkens zou er eerder sprake zijn van ernstig ongerief.

Alles overwegende komt de DEC tot het oordeel dat een inschatting "cumulatief matig ongerief" op zich een goede weergave is van het ongerief in het licht van wat er in de Wet op de dierproeven bedoeld wordt met de term "ongerief".

Dit alles neemt niet weg dat de DEC oog heeft voor het feit dat het zeer langdurige experimenten betreft, waarin de dieren gedurende langere periodes dagelijks worden ingezet in experimenten waarin zij met hun hoofd worden vastgezet, dorstgevoelens hebben en taken moeten verrichten waarmee zij vloeistof kunnen verdienen. Wellicht wennen zij hieraan en ervaren ze het – na die gewenning – niet als ongerief, maar feit is dat de dieren jarenlang in gevangenschap leven en hun leven volledig in het teken staat van deze experimenten. Het betreft dieren die zowel sociaal als psychologisch zeer complex zijn en dit stelt hoge eisen aan de omgeving en de sociale verbanden waarin de dieren leven. Er wordt weliswaar een reeks maatregelen genomen om de dieren een verrijkt leven te bieden maar dit is geen volwaardige vervanging voor een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. Het is echter lastig om te bepalen welke voor de dieren belangrijke natuurlijke gedragskenmerken ze worden ontzegd door de huisvesting en de experimenten en het is daarom moeilijk te bepalen in welke mate dit tot een aantasting van het welzijn en de integriteit van de dieren leidt.

-De aanvrager heeft op verzoek van de DEC informatie verschaft hoe groot de kans is dat het gebruik van een derde dier noodzakelijk zal blijken te zijn. Op basis van eigen ervaring wordt die kans op 22% geschat. De DEC onderschrijft de verwachting dat voor twee van de zes proeven een derde dier noodzakelijk zal blijken en dat daarmee het aantal dieren op maximaal 14 komt.

De DEC concludeert dat het totaal aantal dieren daarom waarschijnlijk op 14 dieren zal uitkomen. Gegeven de door de verantwoordelijke onderzoeker verstrekte informatie over de kans op de noodzaak van een derde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum aantal van 6 experimenten waarvan er 4 met twee dieren zullen worden uitgevoerd en 2 experiment met 3 dieren; dit komt overeen met 33% kans op een derde dier. In het geval de noodzaak ontstaat om voor meer dan twee experimenten een derde dier te vragen is een wijziging noodzakelijk.

-De aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan

vrouwen. Het gebruik van beide geslachten beperkt de mogelijkheden om ideale duo's te vormen voor de huisvesting hetgeen van groot belang is voor het welzijn van de dieren.

-In het kader van het onderzoek naar de functie van de verschillende iteraties van de prothese zullen de dieren worden gedood om zo inzicht te krijgen naar de lange termijneffecten van de geïmplanteerde arrays op het hersenweefsel zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1. Deze ex vivo analyse verschaft belangrijke informatie over de lange termijn effecten en veiligheidsrisico's bij toekomstige implantatie in de mens. In het kader van het onderzoek naar het verkrijgen van wetenschappelijke inzichten om de opeenvolgende protheses te verbeteren (bijlage 3.4.4.2) is het doden van het dier noodzakelijk als ex vivo de posities van de implantaten nauwkeurig moet worden bepaald. Blijft een naar verwachting klein aantal dieren waarvoor deze noodzakelijkheid niet aanwezig is en voor deze dieren zullen de mogelijkheden worden overwogen om ze blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum (zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>). De DEC wijst erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing beperkt zijn, een extra chirurgische ingreep vereisen, en het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier (de DEC signaleert m.b.t. de herplaatsing een dilemma). De DEC adviseert dat voor wat betreft de besluitvorming rondom een eventuele herplaatsing wordt verwezen naar genoemd NCad document (i.h.b. pagina 42-45). In het kort; de vergunninghouder besluit, geadviseerd door de IVD.

Ethische afweging van de DEC:

CITAAT.

1. Rechtvaardigt het ontwikkelen van een hersenschorsprothese om zo voldoende kennis te hebben om de eerste tests met de prothesen in blinde mensen te kunnen opstarten het cumulatieve matige ongerief dat maximaal 14 resusapen wordt aangedaan in het voorliggende project de subdoelen daarbij in aanmerking nemend?

2. De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5): Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: maximaal matig nadeel. Dit nadeel bestaat uit meerder periodes van matig ongerief ten gevolge van het uitvoeren van de proef en uit langere periodes van licht ongerief door de uitvoering van complexe visuele gedragstaken. De dieren zullen onder de gegeven huisvestingscondities, ondanks de

uitgebreide reeks maatregelen om het welzijn te verbeteren, niet hun gehele repertoire aan natuurlijk groepsgedrag tot uiting kunnen brengen. Waarden/belangen van de onderzoekers: veel voordeel. Deze belangen bestaan voornamelijk uit het verbeteren van hun positie in het betrokken wetenschappelijke veld. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht voor de ethische afweging.

Waarden/belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie en de oogheelkunde: veel voordeel. De huidige kennis over de mogelijkheden van array implantaten om tot verbetering van gezichtsvermogen te komen is beperkt. Het voorgenomen project zal unieke gegevens genereren die inzichten geven voor de mogelijkheden van een prothese in de mens en er zal naar verwachting beter inzicht worden verkregen in de processen betrokken bij de verwerking van visuele stimuli.

Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, andere wetenschapsgebieden): veel voordeel. De aanpak biedt een reële mogelijkheid om een functionele prothese voor patiënten te ontwikkelen. Dit zal voor hen resulteren in een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven. Op dit moment zijn zowel de voordelen en de risico's in de vorm van ernstige complicaties voor de patiënten nog niet helder. De dierexperimenten zijn een essentiële stap om duidelijkheid te krijgen op deze punten zodat de eerste stap naar het toepassen van de prothese op mensen een ethisch verantwoorde stap is.

3. De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:

o Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename de technische en fundamenteel wetenschappelijke kennis die noodzakelijk is om de eerste trials in patiënten op een ethisch verantwoorde manier mogelijk te maken. De experimenten op niet-humane primaten zijn naar opvatting van de DEC de enige manier om uiteindelijk te komen tot een bruikbare prothese voor blinden.

o De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

o Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar

verwachting, beperkt blijft tot maximaal matig ongerief. Zie voor een uitgebreide motivatie onderdeel C10.

o De DEC is er van overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis. Verschillende subsidiegevers steunen het project.

o De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.

o De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over de volgende onderwerpen: alternatieve diersoorten, de procedure rondom incorporatie van de DEC protocollen oude stijl in deze aanvraag, de haalbaarheid van de doelstelling, waterrestrictie, het boek van Naumann, stand van zaken op het terrein van hersenprotheses, het doden van de dieren, de experimenten gericht op het uittesten van optogenetische stimulatie, de doelen en het aantal reserve dieren.

De DEC geeft aan dat het voorstel voor de optogenetica proeven, waar de DEC grote moeite mee had, uit de aanvraag is verwijderd.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Gegeven de informatie over de kans op de noodzaak van een derde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum van 14 dieren die het mogelijk maken 6 experimenten uit te voeren waarvan 4 experimenten met twee dieren en 2 experimenten met 3 dieren; dit komt overeen met 33% kans. In het geval de noodzaak ontstaat om voor meer experimenten een derde dier te vragen is een wijziging noodzakelijk.

Een plan van aanpak over te leggen aan de CCD met betrekking tot die apen die niet worden gedood in verband met het noodzakelijke onderzoek naar de plaatsing van de array en eventuele schadelijke bijeffecten aan de hersenen.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  
CITAAT.

De DEC heeft een aantal dilemma's gesignaleerd die binnen of buiten de context van het project vallen.

Tijdens de uitvoering van de proef zullen de dieren nadat de proeven zijn voltooid opnieuw worden gebruikt voor vervolgentoelagen waarbij de dieren opnieuw moeten worden geopereerd. Het voordeel is dat het aantal dieren hierdoor met de helft zal verminderen. Het nadeel is dat het ongerief voor een individueel dier zal toenemen maar dat een extra periode van gewenning aan de faciliteit en trainingsprocedures wordt voorkomen. De DEC volgt de motivering van de aanvragers m.b.t. het gebruik van een dier voor vervolgentoelagen maar omdat het ongerief van het individuele dier groter wordt is het ook denkbaar dat het gebruik van meer dieren te prefereren is.

De inschatting van het cumulatieve ongerief is bij proeven met resusapen van een duur tot wel 4 jaar is niet eenduidig. Binnen de 4 jaar zijn er meerdere korte periodes van matig ongerief ten voornamelijk als gevolg van de chirurgische ingrepen. De ingrepen vinden plaats onder anesthesie en met pijnbestrijding en het matige ongerief wordt daarom voornamelijk veroorzaakt door desoriëntatie na het bijkomen uit de verdoving. Het interval tussen de ingrepen is dusdanig dat de dieren volledig herstellen. De DEC en de aanvrager schatten het cumulatief ongerief in als matig (zoals gemotiveerd in het advies); echter de volledige lijst van alle ingrepen en de langdurige gedragstaken over 4 jaar is dusdanig lang dat de effecten ervan op het dier niet met zekerheid zijn te voorspellen en dat dus niet valt uit te sluiten dat er onder omstandigheden toch ook ernstig cumulatief ongerief kan optreden.

De DEC heeft geconstateerd dat na afloop van de proeven beschreven in bijlage 3.4.4.2 er een aantal dieren zal zijn waarvoor geen wetenschappelijke noodzaak bestaat ze te doden. Deze dieren komen voor herplaatsing in aanmerking omdat voldaan lijkt te zijn aan de voorwaarden genoemd in artikel 13d van de Wod (de gezondheidstoestand van het dier herplaatsing toelaat; (b) er geen gevaar bestaat voor de volksgezondheid, de diergezondheid of het milieu; en (c) passende maatregelen genomen zijn om het welzijn van het dier te waarborgen). De verantwoordelijk onderzoeker stelt in de bijlage dat de mogelijkheden zullen worden overwogen om het dier blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum (zie het NCad advies: Herplaatsing proefdieren). De verantwoordelijkheid rondom de besluitvorming is beschreven in het NCad document en biedt voldoende waarborgen voor een zorgvuldige besluitvorming. In de besluitvorming zal worden betrokken dat herplaatsing een extra chirurgische ingreep

	<p>vereist en dat het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier. De afweging of dit extra ongerief gerechtvaardigd is t.o.v. de voordelen van herplaatsing zal een dilemma zijn. Verder wijst de DEC erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing in een apenopvang en het nationaal primaten centrum echter beperkt zijn. Dit kan leiden tot het besluit tot doden van een dier hoewel het in principe geschikt is voor herplaatsing. De DEC vraagt aandacht voor dit probleem.</p>
--	--

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	Het DEC-advies is volledig.
	Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid.

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Belangen-verstrengeling</b>	Geen van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie gehad met de aanvrager die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd of heeft andere belangen die mogelijk zouden kunnen leiden tot oneigenlijke beïnvloeding.
<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>CITAAT.</p> <p>The aim of this study is to develop a visual prosthesis in macaque monkeys with the ultimate aim of translating this device to blind human patients after the work on this license is completed.</p> <p>The key questions we will address are:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Which layers should be targeted by the electrodes of the prosthesis and is it possible to micro-stimulate specific layers of cortex?</li> <li>2) Is it possible to create perceptual grouping of phosphene patterns and figure-ground segregation by micro-stimulating higher visual areas together with V1?</li> <li>3) Is it possible to direct attention to some phosphenes while ignoring others and how does this attention process impact on neural activity in higher brain areas, including those involved in the generation of eye movements?</li> </ol>

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>CITAAT.</p> <p>Scientific relevance</p> <p>The experiments described here will further our knowledge about the relationship between electrical micro-/optogenetic stimulation and phosphene perception. We know little about the effects of simultaneous micro-stimulation of multiple electrodes and the results will not only guide our design of the visual prosthesis but will also be of great interest to those designing brain-machine interfaces. Important aspects about the link between neural activity and visual perception have remained unknown. The contribution of neural activity in different layers, in different visual areas and at different time-points to forming the visual image is an area of active research and the answers will not only be of importance for the development of a visual prosthesis but also of fundamental importance to understanding the human brain.</p> <p>Social relevance</p> <p>The experiments described here will contribute to the design of a visual prosthesis aimed at bypassing the compromised retina of blind patients and directly transmitting camera images to the visual brain, hence creating artificial visual perception. 40 million people suffer from blindness worldwide. Patients with a damaged visual system can be classified into two groups: those for whom the damage occurs somewhere along the visual processing pathway up to and including the photoreceptor layer in the retina; and those for whom damage occurs after this processing stage. For the former group of patients, significant progress has been made towards solutions in the form of retinal prostheses, stem cell transplants, and gene therapy. However, these treatments only benefit patients in whom the retinal ganglion cells that connect the eye to the brain have been spared. According to estimates by the company Second Sight Medical Products, approximately 6 million blind people worldwide, including patients suffering from glaucoma, diabetic retinopathy, or optic nerve damage, will not be able to benefit from a retinal prosthesis. For these patients, whose sight cannot be restored via the retina, the long-held dream is hence to restore visual function by interfacing directly with the visual cortex. Furthermore, this project will contribute greatly to our understanding of how the brain gives rise to visual perception. Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Voldoende onderbouwd

<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	CITAAT. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De voorstellen bouwen voort op de ruime kennis en ervaring die is verkregen door de uitvoering van technisch sterk vergelijkbare experimenten met resusapen binnen de groep.
---	---

<b>3V's</b> Vervanging	
	<p><b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks:</b>  CITAAT. Our long-term goal is to develop an implantable neuroprosthetic device that restores a limited form of vision to blind people. To accomplish this, we must demonstrate how this technology can be used to generate artificial visual percepts that are useful to humans in daily life. It is not ethical to test this device in human patients without any knowledge of the functioning of the device or the tissue damage that the device could potentially cause, it must therefore first be tested in an animal model. Monkeys are the best option for the development of a visual neuroprosthesis that is intended for human use for the following reasons: 1) We need to implant a large, complex neural interface in the visual cortex, which precludes the use of rodents who have a considerably smaller visual system 2) The tasks required for this study require a species that can recognize and disambiguate complex visual stimuli 3) To train animals on behavioural tasks that involve eye-movements, the study requires awake behaving monkeys. Given these research goals, no alternative to macaque monkeys is available</p>
	<p><b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks:</b>  CITAAT. The main aims of this application are to develop a visual prosthesis to treat blindness and to obtain the knowledge necessary to do this about the functioning of the visual system. To investigate visual perception we require an animal that can fixate on a small region of a screen and report its percept. The animal must be able to be trained to disambiguate complex visual stimuli such as letters or complex objects and understand cues such as attentional cues and 'go' cues. Only primates such as macaques and humans are able to perform such complex tasks. The experiments are invasive as they require the implantation of a head-post and intracranial implants such as electrode arrays. It is not possible to use non-invasive techniques such as fMRI in humans to investigate these research questions as the temporal resolution of the technique is insufficient to study neural interactions between different areas which occur on the order of milliseconds, and our research questions require measurements of activity on the scale of small groups of cells. Furthermore, it is not possible to non-invasively (transcranially) stimulate the human brain with sufficient spatial specificity to produce patterns of phosphenes. These experiments can therefore not be performed in humans. It would be impossible to develop a suitable prosthesis in an animal with a smaller visual cortex given the space needed to place 1000 electrodes or more. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks:</b> CITAAT. The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. If possible, we will re-use the animals used in this procedure in further experiments leading to a reduction in the total number of animals used. Similarly, if possible we will reuse animal from other procedures/licenses for the studies described here. We estimate the total amount of re-use to be around one half, thus while we require a maximum of 7 animals to answer our research questions, we expect that 2-3 will come from other experiments, these animals could come from the experiments described in 3.4.4.2 or from future CCD approved licenses. Please see the included flow-charts for further details.</p>
	<p><b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks:</b> CITAAT. The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. We reduce the total number of animals used by training individual animals on multiple tasks so that the data from a single animal contributes to multiple research questions. Furthermore, if possible, we can implant further electrodes/chambers in the other hemisphere after recordings are no longer possible from the original electrodes. This allows us to increase the total number of recordings made and to collect behavioural data on multiple research questions. Similarly, if possible we will reuse animal from other procedures/licenses for the studies described here. We estimate the total amount of re-use to be around one half, thus while we require maximally 7 animals to answer our research questions, we expect that approximately 2-3 will come from other experiments. Please see the included flow-charts for further details. Several of the techniques described below under 'refinement' also contribute to a reduction in animal numbers as they improve the stability of implants allowing sampling of more data so that, if possible, the research question can be answered using data from only two animals.</p>

Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks:</b>  CITAAT. All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, our implants (such as head posts and neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities. Six, all eye-movement measurements are made using video-cameras rather than the more invasive scleral coil technique.</p>
	<p><b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks:</b>  CITAAT. All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, our implants (such as head posts and neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, 3D printed, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities. Six, all eye-movement measurements are made using video-cameras rather than the more invasive scleral coil technique.</p>
<p><b>Wettelijk vereist onderzoek</b>  Indien ja, is er sprake van herhaling?</p>	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.
<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks: CITAAT. The electrode arrays implanted in these animals can provide functionally useful signals for periods of several years. After the experiments of this procedure have been completed with these animals they can be retrained to perform other cognitive tasks without any further surgical interventions. In some cases, it may be possible to further implant an animal with an extra array/chamber in the opposite hemisphere. In these cases, the animals will be transferred to the relevant protocol. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives a maximum of two intracranial implants and has not undergone serious discomfort. Re-use is preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals.

3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks: Zie 3.4.4.1.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks</b>	HEP: 0-5%	CITAAT. Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The monkey will be monitored for its general appearance and activity level. If a monkey has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, weight loss, reduction in activity level) then we will notify the IvD and evaluate the animal together with the veterinarian. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian. In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight in 2 consecutive days then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized (this only occurred once in the past 10 years).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100% Matig	
<b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks</b>	HEP: 0-5%	Zie 3.4.4.1.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	

## 5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen.

Onderzoek met niet-humane primaten mag alleen uitgevoerd worden als wetenschappelijk kan worden onderbouwd dat het doel van het project niet kan worden bereikt anders dan met niet-humane primaten. Het Secretariaat is het met de DEC eens dat de aanvrager dit voldoende heeft onderbouwd.

De aanvrager geeft aan alleen maar mannelijke dieren te gebruiken. Het Secretariaat is van mening dat dat voldoende is onderbouwd.

De aanvrager geeft aan dat dieren in principe sociaal gehuisvest worden (duo's). Na de operatie zullen de dieren echter voor enkele dagen individueel gehuisvest worden ter bevordering van het herstel van de dieren. Het Secretariaat is van mening dat dit voldoende is onderbouwd.

De vloeistofopname van de dieren wordt beperkt (voor training en uitvoering van taken). Het Secretariaat is van mening dat dit voldoende is onderbouwd. De aanvrager neemt daarnaast voldoende maatregelen om uitdroging en andere negatieve effecten te voorkomen. De NCad werkt momenteel aan een code of practice voor water- en voedseldeprivatie bij proefdieren. Aangezien deze code of practice nog niet is gepubliceerd, kan deze niet meegenomen worden bij de beoordeling van deze aanvraag.

De DEC heeft uitgebreid stilgestaan bij de aanvraag van extra dieren. Het aantal dieren is door de DEC ingeperkt tot 14 dieren. Een deel van deze dieren worden momenteel gebruikt in al eerder goedgekeurde DEC protocollen. Indien deze aanvraag vergund wordt zullen de dieren worden overgezet op deze vergunning.

De DEC geeft aan dat het ongerief goed is ingeschat (matig), maar dat over een periode van 4 jaar niet valt uit te sluiten dat er onder omstandigheden toch ook ernstig ongerief kan optreden. Het Secretariaat betwijfelt of het ongerief inderdaad beperkt blijft tot matig. Het gaat hier om proeven waarbij dieren invasieve chirurgie ondergaan, meerdere keren bijkomen uit narcose, langdurig vastzitten in een stoel voor gedragstesten en de vloeistofopname beperkt wordt. Het Secretariaat vindt het van belang dat de aanvrager hier in de beoordeling achteraf expliciet aandacht aan besteed.

De aanvrager geeft aan dat dieren, vanwege de lange duur van de experimenten (>1 jaar) tijdens de uitvoering van de proef al ingezet worden voor andere proeven. De DEC benoemt dit als dilemma, omdat het gebruik van dieren in andere proeven mogelijk ook additionele operaties vereist waardoor het cumulatieve ongerief voor het individuele dier kan toenemen. Aangezien de proef nog niet beëindigd is, zou het ongerief veroorzaakt door de handelingen meegenomen moeten worden bij de bepaling van het cumulatieve ongerief. Anderzijds leidt dit tot vermindering van het aantal dieren. Het Secretariaat is het met de DEC eens dat dit een dilemma is: weegt vermindering zwaarder dan een toename van het ongerief bij individuele apen? Bovendien kan het uitvoeren van additionele handelingen aan dieren voor andere doeleinden het behalen van de doelstelling in gevaar brengen. Dit bemoeilijkt de ethische afweging. Aangezien er geen inzicht is gegeven in de doelstellingen waar de dieren additioneel voor gebruikt worden, er geen inzicht is in het ongerief dat de dieren als gevolg van de additionele

handelingen ondergaan en er geen inzicht is op het effect van de additionele handelingen op de haalbaarheid van de proeven in deze aanvraag, adviseert het Secretariaat het gebruik van dieren voor additionele handelingen tijdens de proef op dit moment niet toe te staan. Dit zou expliciet in de vergunning moeten worden opgenomen.

In lijn met de beleidsregels 'Meldingen in het kader van een projectvergunning' dient de aanvrager een nieuwe aanvraag in te dienen voor onderzoek naar additionele doeleinden. Het Secretariaat adviseert de CCD de aanvrager hier in de vergunning op te wijzen. De aanvrager zou in de nieuwe vergunningaanvraag moeten melden dat dieren uit de huidige aanvraag gebruikt gaan worden. Op dat moment kan ook beoordeeld worden wat het effect is op de proeven in de huidige aanvraag. Indien er geen effect is op de haalbaarheid van de doelstelling in de huidige vergunning en het cumulatieve ongerief beperkt blijft tot 'matig' zou de CCD kunnen overwegen dit toe te staan. Om de mogelijkheid open te houden bij de beoordeling van een aanvraag voor de additionele handelingen de vergunning voor de huidige aanvraag te kunnen wijzigen of intrekken, adviseert het Secretariaat dit al in de vergunning voor de huidige aanvraag te vermelden.

Hoewel er formeel gezien geen sprake is van hergebruik, vindt het Secretariaat van belang wel bij de regelgeving voor hergebruik aan te sluiten. Dit betekent dat de dieren in voorgaande en opvolgende proeven geen ernstig ongerief mogen ondergaan. Indien de CCD van mening is dat het cumulatieve ongerief in de huidige proeven 'ernstig' is in plaats van 'matig' (zie boven), zou, ook bij de beoordeling van een toekomstige aanvraag, niet toegestaan mogen worden dat handelingen voor additionele doeleinden worden uitgevoerd.

De DEC spreekt verder haar zorg uit over het mogelijk doden van dieren om andere dan wetenschappelijke redenen. In het voortraject heeft de DEC hierover contact opgenomen met het Secretariaat en gevraagd of het mogelijk is voorwaarden te verbinden aan herplaatsing van dergelijke dieren. De juristen van de CCD geven aan dat dit niet mogelijk is, omdat er geen verplichting tot herplaatsing in de wet is opgenomen. Dit heeft het Secretariaat ook de DEC laten weten. De DEC stelt in plaats daarvan nu voor een voorwaarde in de vergunning op te nemen dat de aanvrager een plan van aanpak aan de CCD overlegt met betrekking tot de bestemming van deze dieren. Het Secretariaat is van mening dat dit niet als voorwaarde in de vergunning opgenomen kan worden, omdat een dergelijke voorwaarde verder gaat dan de wet. Het zou wel mogelijk zijn een borgende voorwaarde te stellen die de aanvrager verplicht de code of practice van de NCAD (p42-45 Herplaatsing van voormalige proefdieren) toe te passen bij het bepalen of herplaatsing van de dieren mogelijk is. Uiteindelijk bepaalt de vergunninghouder dan nog steeds of een dier herplaatst wordt, maar is het wat minder vrijblijvend dan nu in de aanvraag staat beschreven.

De aanvrager geeft aan dat er overlap is met lopende DEC protocollen. Om overlap te voorkomen, adviseert het Secretariaat een voorwaarde te stellen waarbij na vergunning van deze aanvraag dieren en experimenten uit eerder goedgekeurde DEC protocollen formeel onder deze vergunning gaan vallen. Deze handelswijze is in lijn met eerdere aanvragen.

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

Het Secretariaat volgt het DEC-advies, maar stelt voor aanvullende voorwaarden te stellen. Het Secretariaat adviseert dit project toe te wijzen. Voorstel is om de vergunning te verlenen van 4-7-2017 tot en met 1-7-2022. Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

#### **Voorwaarden**

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 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.

- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren

bij dieren voor beëindiging van de proeven.

-Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doeleinden dient een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

- Indien dieren niet gedood hoeven te worden om wetenschappelijke redenen en niet hergebruikt kunnen worden in andere proeven, dient de aanvrager de code of practice van de NCAD (p42-45 Herplaatsing van voormalige proefdieren) toe te passen om te bepalen of herplaatsing van de dieren mogelijk is.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

14

**Van:** Info-zbo  
**Aan:** "secretariaat DEC"  
**Onderwerp:** RE: status afhandeling AVD-10.2.g 20171046 ?  
**Datum:** woensdag 5 juli 2017 14:55:42

---

Geachte heer 10.2.e en 10.2.g,  
Deze aanvraag is inderdaad afgelopen vrijdag in de vergadering besproken. De CCD heeft nog enkele vragen. Deze vragen zullen morgen aan u worden toegezonden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** secretariaat DEC [mailto:10.2.g

**Verzonden:** woensdag 5 juli 2017 13:45

**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl'

**Onderwerp:** status afhandeling AVD-10.2.g 20171046 ?

13

Geachte CCD,

Namens de verantwoordelijk onderzoeker en de vergunninghouder wil ik informeren naar de stand van zaken van AVD-10.2.g 20171046 met de titel Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind.

De aanvraag is op 2 juni door u ontvangen, ruim op tijd voor de CCD meeting van 23 juni. Gebruikelijk wordt het besluit dan de week daarna verstuurd. Helaas hebben wij nog geen bericht van u ontvangen. Kunt u ons informeren wanneer we een besluit kunnen verwachten. Ook als er een probleem is met de leges dan hoor ik dat graag van u.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

**Van:** secretariaat DEC 10.2.g  
**Verzonden:** maandag 7 augustus 2017 13:30  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD 10.2.g 20171046

**Categorieën:** Dossier: 10.2.e Dossier: 10.2.e

Geachte CCD,

Zojuist heb ik via WebFTP, namens de verantwoordelijk onderzoeker, het geformuleerde antwoord op uw vragen naar de CCD gestuurd.

De 10.2.g ziet geen reden om haar advies n.a.v. het antwoord aan te passen.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

---

**From:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
**Sent:** maandag 10 juli 2017 9:44  
**To:** 10.2.e en 10.2.g ; secretariaat DEC  
**Subject:** vragen bij de behandeling van AVD 10.2.g 20171046

15

Geachte 10.2.e en 10.2.g

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan, uw aanvraag is op 30 juni in de vergadering besproken en hierbij zijn er nog een paar vragen. Wij willen u vragen aanvullende informatie over deze openstaande punten aan te leveren pas daarna kan de behandeling van uw aanvraag afgerond worden. Het betreft uw aanvraag: Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind, met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046.

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

De vergadering van de CCD was verplaatst van 23 juni naar 30 juni, daarom heeft het een week langer geduurd voor wij u bericht sturen over de voortgang van uw dossier. ,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

AVD 10.2.g 2017 1046 m.b.t. Aanvullende informatie

Geachte CCD,

Hierbij stuur ik u de gevraagde aanvullende informatie over onze CCD aanvraag.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

**1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?**

The main reason why we use controlled fluid uptake is that we need to obtain a sufficiently large number of trials per session (typically >600 trials per session), for two reasons. First, we need reliable measures of the animals' perception of visual stimuli and electrically induced neuronal activity. Accurate measures of perception and of phosphene thresholds demand a large number of trials. Second, we obtain a larger number of trials to study the activity of neurons. The activity of neurons is inherently stochastic, i.e. the responses of a cell to repetitions of the same stimulus are variable, a stochasticity that is inherent to proper brain function. Controlled fluid access is by the far the most common method to motivate animals to perform cognitive tasks. We note that only healthy and cooperative monkeys that are at ease will perform these tasks in which they make eye (or arm) movements. Alternative methods have been described by a workgroup for the British NC3R center (National Center for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010):

*Positive reinforcement with fruit juice without controlled fluid uptake.* We use this approach in the early phases of training. The animals receive a small amount of fruit juice for each correct trial they perform. In the initial training phases this approach is sufficient to motivate the animals to perform very simple tasks. However, as task difficulty and the amount of effort required by the animal increases, most animals do not perform sufficient number of trials.

*Food reinforcement.* Animals can be motivated to learn simple tasks using small treats like peanuts, sometimes in combination with 'clicker training' approaches in which the monkey learns to pair a specific sound with a later reward. These approaches work well for simple tasks requiring less than 100 trials, but the animals quickly satiate. Furthermore, the use of food rewards can disturb brain measurements through movement, chewing etc.

*Electrical stimulation of reward centers in the brain.* In this method an electrode is surgically implanted in reward centers and is electrically stimulated if the animal performs a correct trial (Bichot et al., 2011). However, this method involves an extra surgery with the accompanying risks of complications and direct electrical stimulation of the reward centers may interact with the neural processes that are the main focus of this application.

Controlled fluid uptake is the only method available to obtain sufficient numbers of trials without directly electrically stimulating the brain. We implement controlled fluid uptake in a gradual fashion that adapts the level of fluid control to the behavior of each individual. We begin with positive reinforcement using fruit juice without any controlled fluid uptake and only use fluid control regimes

if the animal is not sufficiently motivated to perform the task with no fluid control. We gradually introduce the fluid control with the aim to have the animals drink as much fluid as possible. Nevertheless, in the majority of animals it is necessary to restrict access to fluid to some level to obtain enough trials on the complex behavioral tasks described in the application.

The controlled fluid access protocol described in the application has been shown to produce only mild discomfort if carried out with due care and extensive monitoring (Prescott et al., 2010; Toth and Gardiner, 2000). Research of the NC3R (Gray et al., 2016) demonstrated that our careful protocol is associated with urine measures indicative of well-functioning, healthy kidneys. Changes in behaviors are limited, the main one being an increase in motivation to drink on the stricter fluid control. Another study (Hage et al., 2014) analyzed a broad range of behaviors over several months during fluid control and found no evidence for alterations in behavior, which indicates that the animals' wellbeing can be stably ensured during training sessions with a proper protocol.

We monitor the behavior, weight and fluid intake of the animal on a daily basis and register all details in an electronic database, which is available to other researchers, caretakers and inspectors. Furthermore, the animals are seen regularly by a veterinarian to inspect their general condition, and we investigate measures of kidney function during the yearly checkups. We have never obtained indications of impaired kidney function. Hence, our own experience is in accordance with the literature, which indicates that a careful protocol of controlled fluid uptake is a safe and effective manner to motivate animals to perform cognitive tasks.

**2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.**

According to the EU directive the definition of severe discomfort is:

*"Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience severe pain, suffering or distress, or long-lasting moderate pain, suffering or distress. Procedures, that are likely to cause severe impairment of the wellbeing or general condition of the animals."*

The monkeys will undergo surgical procedures, which lead to, at most, moderate discomfort that is mostly associated with the recovery from anesthesia and lasts a maximum period of 1-2 days. The animals receive strong opioid painkillers for several days after each surgery and do not experience pain. We use advanced anesthetic approaches in which an antagonist to the anesthetic agent is given at the end of the surgery. This leads to very fast recovery times compared to more traditional anesthetics and the animals are alert after 1h. They resume eating the same day or occasionally on the next day. The discomfort associated with these surgeries is therefore at the lower end of moderate and we can exclude that the animals suffer acute severe discomfort due to the surgical procedures.

The second part of the definition refers to a situation with 'long-lasting moderate pain, suffering and distress'. One question might be whether the successive procedures would cause cumulative suffering that is more than that caused by the individual procedures. There is no indication that this is the case. One report has been published that specifically addresses this concern (Pickard, 2013). The report of the Animal Procedures Committee by the UK government states:

*“Specifically, there was little evidence in the majority of non-human primates to suggest that “the nature of pain, suffering, distress, and its intensity, the duration, frequency and multiplicity of techniques employed” and the “cumulative suffering within a procedure after applying all appropriate refinement techniques” (Directive 2010/63/EU) should have increased the severity assessment over that for single events/procedures alone”.*

The report also indicates that there was no increase in discomfort through incomplete recovery between events ('stacking') or potentiation of adverse effects and suffering by earlier procedures. Many animals instead showed signs of diminished responses to repeated procedures such as restraint and handling.

Furthermore, we have taken several measures to exclude the possibility that the cumulative discomfort can exceed the moderate level:

*Extensive monitoring.* The behavior and health of the animal is carefully monitored by the researchers, the care-takers and experienced vets and entered in an electronic database, which includes the general appearance of the animal, its weight and the amount of food/drink. In its advice, the DEC stated “echter de volledige lijst van alle ingrepen en de langdurige gedragstaken over 4 jaar is dusdanig lang dat dat de effecten ervan op het dier niet met zekerheid zijn te voorspellen”. Upon request, the chairman of the DEC clarified that this concern related to the possible longer-term ethological and psychological effects on the animals' wellbeing (i.e. not to the animals' medical condition). Although it is very unlikely that these factors could cause cumulative discomfort to exceed the moderate level given the animals' environment (see below under *social housing*), and because the behavior of animals that participate in these experiments is virtually indistinguishable from the behavior of animals that do not, we will ask the opinion of an expert monkey ethologist on a regular basis. If there is a threat that the future cumulative discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be taken out of the experiment (rehomed or euthanized) thereby excluding the possibility of severe cumulative discomfort.

*Long recovery times between surgeries.* Surgical procedures are followed by a minimum of four weeks of recovery. In practice, the interval between the head-post surgery and the implantation of the intracranial implant is at least 6 months, and in the interval between the implantation of the optional baseplate and the intracranial implant at least 3 months. These long intervals ensure the monkeys have fully recovered after the surgeries before any further interventions take place. There is no question of 'stacking' of discomfort due to surgeries close in time.

*Well-integrated surgical implants.* The implants we now use are custom designed for each animal, 3D printed in biocompatible titanium and placed in a sterile operating theatre of the highest standards. The implants integrate well with the bone and the skin and fur grows back fully around the implant. The rate of complications related to these implants is very low.

*Social housing of a high standard.* The animals live in stable social pairs in large floor-to-ceiling cages with natural daylight. The cages are enriched with toys and puzzles and the animals engage in their natural behaviors such as grooming, climbing and foraging for food (e.g. for peanuts hidden in the sawdust on the floor). We see no evidence for stereotypical movements or any evidence that long-term housing causes any suffering for the animals.

*Controlled fluid protocol approach.* Our approach to controlled fluid uptake is to use the mildest form of fluid control necessary to achieve the desired performance of the animal. In the answer to the question above we outlined why the amount of discomfort associated with this procedure is maximally mild.

Given these considerations, the level of discomfort associated with the procedures is maximally moderate and the cumulative level of discomfort experienced by the animals is also moderate. Indeed, the DEC stated: *“Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard in bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de uitvoering van de gedragstaken.”* The (cumulative) discomfort level classification ‘moderate’ is also in accordance with the opinion of (1) our vets, who have ample experience with experiments in monkeys and rate the cumulative discomfort as moderate, (2) we inspected the retrospective assessments of the discomfort experienced by monkeys in similar experiments of the previous five years, and found that they have always been in the moderate category, (3) the opinion of the IvD and (4) our DEC protocols under the previous law have always been at the moderate discomfort level while using similar techniques. The discomfort level has actually become lower over the years, due to refinements of the implants, anesthesia protocols, measurement techniques and enrichments in the monkeys’ environment.

In conclusion, classification of the Animal Procedures as severe discomfort would not be in line with the EU directive given that severe discomfort is reserved for experiments where animals are likely to experience severe pain, suffering or distress, or long-lasting moderate pain, suffering or distress. In the current project application, we have taken measures that ensure that acute and cumulative discomfort levels cannot exceed the moderate level. Even though this is unlikely, as was outlined in the above, if there is a threat that the future cumulative discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be taken out the experiment, thus effectively excluding the possibility of severe cumulative discomfort.

In case of remaining questions about the use of a controlled water intake protocol or about estimated discomfort levels, we would be happy to exchange ideas about these issues with members of the CCD.

#### References

- Bichot, N.P., Heard, M.T., Desimone, R., 2011. Stimulation of the nucleus accumbens as behavioral reward in awake behaving monkeys. *J. Neurosci. Methods* 199, 265–272.
- Gray, H., Bertrand, H., Mindus, C., Flecknell, P., Rowe, C., Thiele, A., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3.
- Hage, S.R., Ott, T., Eiselt, A.-K., Jacob, S.N., Nieder, A., 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. *Lab. Anim.* 48, 82–87.
- Pickard, J., 2013. Review of the assessment of cumulative severity and lifetime experience in non-human primates used in neuroscience research.  
[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/261687](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/261687)

/cs\_nhp\_review\_FINAL\_2013\_corrected.pdf

Prescott, M.J., Brown, V.J., Flecknell, P.A., Gaffan, D., Garrod, K., Lemon, R.N., Parker, A.J., Ryder, K., Schultz, W., Scott, L., Watson, J., Whitfield, L., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167–188.

Toth, L.A., Gardiner, T.W., 2000. Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 39, 9–17.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Contactpersoon  
10.2.e

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Betreft: Advies AVD20171046 na aanvullende informatie aanvrager

In de CCD vergadering van 30 juni 2017 is de projectvergunningaanvraag met als titel 'Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind' besproken.

### **Beslissing**

Het bestuur was van mening dat het toepassen van vochtdeprivatie niet voldoende was onderbouwd. Daarnaast was het bestuur van mening dat het in de aanvraag beschreven cumulatief ongerief ook als ernstig gezien kunnen worden in plaats van matig zoals nu geclassificeerd.

Om bovenstaande redenen is besloten de aanvraag aan te houden en aanvullende informatie op te vragen bij de aanvrager.

Het Secretariaat heeft de aanvrager vervolgens onderstaande vragen gesteld:

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

### **Aanvullende informatie**

Op 7 augustus 2017 heeft de aanvrager aanvullende informatie verstrekt. Deze informatie is meegestuurd als vergaderstuk AVD20171046g\_Aanvullende informatie aanvrager.

De aanvrager heeft onderbouwd waarom vochtdeprivatie nodig is en waarom het niet mogelijk is minder ingrijpende methoden te gebruiken om dieren te trainen/motiveren. De aanvrager heeft daarnaast onderbouwd waarom het ongerief niet als ernstig geclassificeerd zou moeten worden.

Het Secretariaat heeft bij de NVWA nagevraagd hoe dergelijke proeven tot dusverre zijn geclassificeerd. Uit de registratie blijkt dat in 2015 en 2016 deze proeven als matig ongerief zijn geclassificeerd. Hierbij acht de NVWA het van belang dat de dieren vooraf geselecteerd worden op geschiktheid, geborgd wordt dat dieren maximaal een milde druk

ondervinden van de vochtdeprivatie en dat dieren langzaam gewend worden aan de deprivatie. Zie het aanvraag AVD20172425 (AVD20172425b\_AdviesNotaCCD) voor de volledige reactie van de NVWA.

### **Samenvatting**

Het Secretariaat is van mening dat de aanvrager de vragen in voldoende mate heeft beantwoord om tot een oordeel te kunnen komen.

Het Secretariaat is van mening dat de aanvrager voldoende heeft onderbouwd waarom vochtdeprivatie nodig is en waarom andere, mildere, methodes niet altijd volstaan. Daarnaast is het Secretariaat van mening dat het ongerief als matig kan worden ingeschat: de dieren worden langzaam gewend aan de deprivatie en dieren krijgen voldoende tijd om te herstellen van de operaties.

### **Voorstel Besluit**

Het Secretariaat adviseert de vergunning te verlenen voor de aangevraagde periode van 5 jaar (van 30-08-2017 t/m 01-07-2022).

In de oorspronkelijke AdviesNotaCCD is aandacht besteed aan de wens van de aanvrager om dieren gedurende de voor dit project aangevraagde dierproeven al in te zetten voor dierproeven met andere doelstellingen.. Aangezien er geen inzicht is gegeven in de doelstellingen waar de dieren additioneel voor gebruikt worden, er geen inzicht is in het ongerief dat de dieren als gevolg van de additionele handelingen ondergaan en er geen inzicht is op het effect van de additionele handelingen op de haalbaarheid van de proeven in deze aanvraag, adviseert het Secretariaat het gebruik van dieren voor additionele handelingen tijdens dit project op dit moment niet toe te staan. Zie voor uitgebreide argumentatie AVD20171046b2\_Oorspronkelijke AdviesNotaCCD.

Het Secretariaat adviseert om onderstaande specifieke en algemene voorwaarden toe te voegen aan de vergunning:

#### ***Specifieke voorwaarden.***

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren bij dieren voor beëindiging van de proeven.
- Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doelstellingen ten behoeve van andere projecten dient voor de desbetreffende dierproeven een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.
- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

-Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 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.

***Algemene voorwaarden.***

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

-In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g  
10.2.e en 10.2.g

10.2.g



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  
AVD 10.2.g 20171046  
Bijlagen  
1

Datum 31 augustus 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 2 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 10 juli 2017 hebben wij u vragen gesteld over deprivatie en de ongeriefclassificatie. Wij kunnen ons vinden in uw reactie.

#### 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 geeft aan dat dieren, vanwege de lange duur van de experimenten (>1 jaar) tijdens de uitvoering van de proef al ingezet worden voor andere proeven. De DEC benoemt dit als dilemma, omdat het gebruik van dieren in andere proeven mogelijk ook additionele operaties vereist waardoor het cumulatieve ongerief voor het individuele dier kan toenemen. Aangezien de proef nog niet beëindigd is, zou het ongerief veroorzaakt door de handelingen meegenomen moeten worden bij de bepaling van het cumulatieve ongerief. Anderzijds leidt dit tot vermindering van het aantal dieren. Wij zijn het met de DEC eens dat dit een dilemma is: weegt vermindering zwaarder dan een toename van het ongerief bij individuele dieren? Bovendien kan het uitvoeren van additionele handelingen aan dieren voor andere doeleinden het behalen van de doelstelling in gevaar brengen. Dit

bemoeilijkt de ethische afweging. Aangezien er geen inzicht is gegeven in de doelstellingen waar de dieren additioneel voor gebruikt worden, er geen inzicht is in het ongerief dat de dieren als gevolg van de additionele handelingen ondergaan en er geen inzicht is op het effect van de additionele handelingen op de haalbaarheid van de proeven in deze aanvraag, kunnen wij het gebruik van dieren voor additionele handelingen tijdens de proef op dit moment niet toe staan. Indien u additionele handelingen wil uitvoeren, dient u in lijn met de beleidsregels 'Meldingen in het kader van een projectvergunning' een nieuwe aanvraag in te dienen voor onderzoek naar additionele doeleinden. In deze aanvraag dient aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. Wij zullen op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

**Datum:**  
31 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g 0171046

-U geeft aan dat er overlap is met lopende DEC protocollen. Om overlap te voorkomen, is een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd waarbij na vergunning van deze aanvraag dieren en experimenten uit eerder goedgekeurde DEC protocollen formeel onder deze vergunning gaan vallen.

U kunt met uw project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" starten. De vergunning wordt afgegeven van 31 augustus 2017 tot en met 1 juli 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.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie 10.2.g [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

10.2.g

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 31 augustus 2017 tot en met 1 juli 2022, voor het project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Voor aanvullende voorwaarden, zie samenvatting.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 mei 2017, ontvangen op 2 juni 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	7	100% Matig	
<b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	7	Matig	

## Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 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.

**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.

Datum:  
31 augustus 2017  
Aanvraagnummer:  
AVD 10.2.g 20171046

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

10.2.e

Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD10.2.0171046

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.

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren bij dieren voor beëindiging van de proeven.

-Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doeleinden dient een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.



Aanvraagnummer:

AVD 10.2.9.0171046

## 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:**  
AVD 10.2.g.0171046

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.

Van: Info-zbo  
 Aan: "secretariaat DEC"  
 Onderwerp: terugkoppeling: AVD 10.2.g 20171046  
 Datum: vrijdag 20 oktober 2017 16:16:26

Geachte DEC,

Op 2 juni 2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De CCD heeft onderstaande voorwaarden verbonden aan de vergunning:

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren bij dieren voor beëindiging van de proeven.

- Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doeleinden dient een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning

formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

Wij hebben de aanvrager een aantal aanvullende vragen gesteld. Zie onderstaande e-mail.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing en de vragen die aan de aanvrager gesteld zijn, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Van: Info-zbo

Verzonden: maandag 10 juli 2017 9:44

Aan: 10.2.e en 10.2.g 'secretariaat DEC'

Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD 10.2.g 20171046

Geachte 10.2.e en 10.2.g

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan, uw aanvraag is op 30 juni in de vergadering besproken en hierbij zijn er nog een paar vragen. Wij willen u vragen aanvullende informatie over deze openstaande punten aan te leveren pas daarna kan de behandeling van uw aanvraag afgerond worden.

Het betreft uw aanvraag: Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind, met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046.

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

De vergadering van de CCD was verplaatst van 23 juni naar 30 juni, daarom heeft het een week langer geduurd voor wij u bericht sturen over de voortgang van uw dossier. ,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Namens Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

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