

	Dossier: AVD1080020173847	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
6.1	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
6.2	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X
8		
9		
10		



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Vorming en veranderingen van remmende hersenverbindingen
1.2 Looptijd van het project	Looptijd 5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Hersenverbindingen, hersenontwikkeling, hersenziekte,

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Hersencellen in het brein communiceren met elkaar door middel van verbindingen die we <i>synapsen</i> noemen. In een synaps wordt een signaal van de ene hersencel (de 'zender') omgezet naar signalen in de volgende hersencel (de 'ontvanger'). Elke hersencel ontvangt ~10.000 synaptische signalen en stuurt signalen naar evenzoveel andere hersencellen, waardoor er complexe netwerken ontstaan.</p> <p>Hersenverbindingen liggen niet vast, maar synapsen veranderen voortdurend. Synapsen kunnen sterker of zwakker worden, en er kunnen ook synapsen gevormd of verwijderd worden. Elke keer als we iets meemaken en/of iets leren, veranderen de synapsen in ons brein een klein beetje. Daardoor reageren</p>
---	--

onze hersencellen een volgende keer net iets anders, waardoor uiteindelijk ons gedrag verandert.

Om deze leer- en aanpassingsprocessen in de hersenen te begrijpen is het van belang om een onderscheid te maken tussen stimulerende (*excitatoire*) en remmende (*inhibitoire*) synapsen. De stimulerende synapsen zijn veruit in de meerderheid en er is redelijk veel over deze synapsen bekend. Het wordt echter steeds duidelijker dat juist de remmende synapsen een cruciale rol spelen in het leer- en aanpassingsvermogen van ons brein. We weten nog te weinig over de remmende synapsen.

In veel hersenziekten gaat er iets mis op het nivo van de synaps. Voorbeelden hiervan zijn epilepsie, autisme, schizofrenie, en de ziekte van Alzheimer. Om te begrijpen hoe deze ziektes ontstaan, en belangrijker: hoe we ze uiteindelijk kunnen voorkomen of genezen, moeten we beter begrijpen hoe synapsen gevormd worden en hoe ze kunnen veranderen. De focus van ons onderzoek ligt op de remmende, *inhibitoire*, synapsen. We proberen de moleculen te identificeren die een rol spelen in de vorming en aanpassing van deze synapsen en signaalroutes te ontrafelen die belangrijk zijn voor het leer- en aanpassingsvermogen van onze hersenen.

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

In dit onderzoek bestuderen wij de processen die plaatsvinden tijdens de vorming van synapsen en we identificeren de signaalmoleculen die een rol spelen in veranderingen in deze synapsen. Dit doen we op verschillende manieren. We maken synapsen zichtbaar onder de microscoop en we volgen de veranderingen in hun aantal, vorm en grootte. We identificeren en analyseren moleculen die betrokken zijn bij synaptische veranderingen en we analyseren wat er gebeurt als we veranderingen aanbrengen. We meten ook de elektrische signalen die door de synapsen worden overgebracht in de hersencellen. Door het identificeren van belangrijke signaalmoleculen en het ontrafelen van signaalroutes kunnen we beter begrijpen wat er gebeurt als het brein zich aanpast, zoals tijdens de ontwikkeling en tijdens leren, of als gevolg van een ziekte of verwonding.

Dit onderzoek moet leiden tot een beter begrip van de werking van het brein en bijdragen tot het ontwikkelen van eventuele behandelingen van hersenziekten.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er zijn maximaal 2080 muizen en 520 ratten nodig.

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

De dieren worden naar het lab vervoerd en daar gedood ten behoeve van het verkrijgen van hersenweefsel.

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

Verwacht ongerief is voor alle dieren licht.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden gedood en hun hersenen worden uitgebreid geanalyseerd.

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

De vorming en aanpassing van synapsen zijn ingewikkelde processen. De vorming van synapsen wordt sterk beïnvloed door de omgeving van de hersencellen (het omringende hersenweefsel) en die is helaas niet in kweekschalen na te bootsen. Hierdoor blijft het gebruik van intact hersenmateriaal van proefdieren voor deze experimenten noodzakelijk. Voor de interpretatie van onze data (de gevolgen van synaptische veranderingen voor de functie van de hersencellen) maken we gebruik van computermodellen.

4.2 Vermindering

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

We onderzoeken eerst de werking van de moleculen in kweekschalen. Na literatuurstudie voeren we gefaseerde studies uit in kleinschalige dierstudies, waarbij we bepalen wat nodig is om wetenschappelijk verantwoorde conclusies te kunnen trekken. Indien mogelijk maken we gebruik van computermodellen.

4.3 Verfijning

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

De proeven met muizen en ratten voeren we uit in goed opgezette experimenten waarmee we ruime ervaring hebben. Muizen en ratten zijn zeer geschikt als modeldier, omdat de moleculaire processen die synaptische plasticiteit reguleren in deze knaagdieren sterk overeenkomen met die in de mens.

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

De dieren worden intensief geobserveerd, de dieren worden in groepen gehuisvest en er is kooiverrijking (speelmateriaal). We controleren dagelijks hun welzijn. In het geval van onverwachte omstandigheden treffen we maatregelen of wordt in overleg met de toezichthouders besloten tot levensbeëindiging. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd, ervaren en competent personeel.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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, of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <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	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	[REDACTED] [REDACTED]
		IBAN	NL271INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Associate Professor
		Afdeling	Biologie departement, Betafaculteit
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 1 - 2018 |
| Einddatum | 1 - 1 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Vorming en veranderingen van remmende hersenverbindingen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

voorzitter CVB Universiteit Utrecht

Utrecht



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Ons brein bestaat uit miljoenen hersencellen die met elkaar communiceren door middel van synaptische verbindingen. De synaptische verbindingen tussen hersencellen bepalen de 'route' die informatie (bijvoorbeeld afkomstig van zintuigen) door het brein aflegt en uiteindelijk het gedrag van het organisme. Tijdens de ontwikkeling, worden de hersenverbindingen aangelegd volgens een patroon dat vooral bepaald wordt door genetische factoren. Maar dit patroon verandert tijdens de loop van het leven. Het bijzondere van de synaptische verbindingen in het zoogdierenbrein (dus inclusief het menselijke brein) is, dat zij niet vastliggen, maar voortdurend aangepast worden. Door de aanpassingen van hersenverbindingen wordt informatie op een andere manier, of door andere hersencellen, verwerkt en heeft dus een andere uitwerking op het gedrag van het organisme. Door synapsen te veranderen past het brein zich aan aan zijn omgeving en leert het van ervaringen. Het aanpassingsvermogen van synapsen, ook wel synaptische plasticiteit genoemd, is dus een essentiële eigenschap van hersenweefsel die van cruciaal belang is voor het aanpassingsvermogen, en daarmee de overlevingskansen, van het organisme. Datzelfde aanpassingsvermogen van synapsen vormt tegelijk ook een risico: in sommige gevallen worden verkeerde aanpassingen gemaakt of vinden aanpassingen op verschillende plekken plaats die niet op elkaar afgestemd zijn. In zulke gevallen wordt de informatieverwerking in het brein aangetast en kunnen er hersenziektes of -aandoeningen ontstaan.

Van alle synaptische verbindingen is de meerderheid excitatoir (stimulerend), en 10-20% van de synapsen zijn inhibitorisch (remmend). Voor het optimaal functioneren van hersencellen (reageren op de juiste prikkels, negeren van niet-relevante prikkels) is het van belang dat excitatoire en inhibitorische signalen op elkaar afgestemd zijn. Tot voor kort werd ervan uitgegaan dat vooral plasticiteit van excitatoire synapsen belangrijk is voor het aanpassingsvermogen van het brein. Maar steeds meer recent onderzoek, [redacted] (Keck et al. 2011) toont aan dat inhibitorische plasticiteit minstens zo cruciaal is. In veel gevallen vinden er eerst veranderingen plaats aan inhibitorische synapsen voordat de excitatoire veranderingen kunnen plaatsvinden.

[redacted] onderzoeksgroep is een van de weinige onderzoeksgroepen in de wereld die onderzoek doet naar de vorming en plasticiteit van inhibitorische synapsen. [redacted] laten zien dat inhibitorische synapsen zeer dynamische structuren zijn (Wierenga et al 2008; Schuemann et al 2015), die snel kunnen reageren op signalen uit de omgeving ([redacted] gereviewed in Frias et al. 2015). Deze dynamische eigenschappen zijn erg belangrijk voor het aanpassingsvermogen van het brein. [redacted] bijvoorbeeld laten zien dat inhibitorische synapsen in de visuele cortex binnen enkele uren reageren op schade aan het oog (Keck et al. 2011). Er zijn nog veel onduidelijkheden over de precieze moleculaire processen die zich tijdens deze dynamische veranderingen afspelen. [redacted] bijvoorbeeld niet waardoor de vorming van een inhibitorische synaps getriggerd wordt, hoe deze wordt beïnvloed door neuronale activiteit en in welke volgorde de complexe moleculaire specialisatie in nieuwe inhibitorische synapsen wordt opgebouwd (Wierenga 2017). Ons onderzoek is erop gericht om deze hiaten in onze kennis op te vullen. Deze kennis is nodig voor een beter begrip van het aanpassingsvermogen van onze hersenen en draagt bij aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmethoden voor hersenaandoeningen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het overkoepelende doel van dit onderzoek is het begrijpen van de cellulaire en moleculaire processen die plaatsvinden tijdens synaptische veranderingen en hoe veranderingen van verschillende synapsen en neuronen in de omgeving op elkaar afgestemd worden. We willen begrijpen hoe deze processen gereguleerd worden door de activiteit en moleculaire signalen van andere synapsen of neuronen in de buurt. Onze focus ligt hierbij op het bestuderen inhibitorische synapsen, en we vergelijken deze vaak met excitatoire synapsen.

De specifieke doelen van dit onderzoek zijn:

- *het identificeren van de verschillende moleculaire stappen en signalen tijdens de vorming van*

inhibitoire synapsen

Uit ons eigen onderzoek en dat van andere onderzoeksgroepen blijkt dat de vorming van een nieuwe synaps een gecompliceerd proces is waarbij verschillende fases doorlopen wordt. Het lijkt erop dat de eerste verandering plaatsvindt in het axon, waarop de tegenovergelegen dendriet reageert en er specifieke eiwitten naar het membraan gebracht worden. Er zijn waarschijnlijk verschillende signalen die over en weer (van axon naar dendriet en vice versa) specifieke moleculaire cascades activeren, waardoor eiwitten in een specifieke volgorde naar de nieuwe synaps gerecruiteerd worden. We hebben aanwijzingen dat deze volgorde niet altijd hetzelfde is en dat 'trial-and-error' processen een belangrijke rol spelen. Oftwel: het is niet precies te voorspellen of een synaps wel of niet gevormd zal worden. Wij proberen de verschillende stappen te ontrafelen en te begrijpen welke signalen van belang zijn.

- *het identificeren van signaalcascades die inhibitoire synapsen beïnvloeden*

Als neuronale netwerken zich aanpassen, gebeurt dit vaak doordat de hersencellen en hun synapsen reageren op signalen uit hun omgeving, zoals hormonen, neurotransmitters, groeifactoren en andere signaalstoffen. Wij willen de signalen identificeren die een rol spelen bij de aanpassing van inhibitoire synapsen en de moleculaire cascades ontrafelen die hierbij geactiveerd worden. Ook willen we precies bepalen welk effect de signalen hebben op de synapsen (bijvoorbeeld versterking/verzwakking van bestaande synapsen, beïnvloeding van synapsvorming, etc.).

- *het identificeren van interacties tussen nabijgelegen inhibitoire en excitatoire synapsen in dendrieten*

Als neuronale netwerken zich aanpassen, moeten veranderingen aan stimulerende (excitatoire) en remmende (inhibitoire) synapsen op elkaar afgestemd worden, zodat het netwerk zijn functie kan blijven uitoefenen. Wij hebben onlangs gevonden dat actieve excitatoire synapsen moleculaire signalen uit zenden waarop nabijgelegen inhibitoire synapsen kunnen reageren. Wij onderzoeken welke signalen worden uitgewisseld tussen nabijgelegen synapsen, onder welke omstandigheden welke signalen worden uitgezonden en hoe deze signalen ervoor zorgen dat veranderingen in synapsen op elkaar afgestemd worden. Hiervoor gebruiken we de opgedane kennis van de twee hierboven beschreven doelen en passen die toe in experimenten waarin we de activiteit van specifieke hersencellen en/of synapsen manipuleren.

- *het bepalen van de nano-structuur van synapsen en hun cellulaire omgeving*

Met moderne superresolutie microscopie is het mogelijk om te bepalen waar eiwitten zich precies bevinden in een synaps met een precisie van enkele tientallen nanometers. We kunnen nagaan of eiwitten aan de rand of in het midden van de synaps zitten, en of zij homogeen of in clusters verdeeld zijn over de membraan. Een eiwit heeft andere interactiepartners aan de rand of in het midden van een synaps en geclusterde eiwitten geven andere signalen af dan individuele eiwitten. Deze zogenaamde nano-structuur van synapsen is dus belangrijk voor de functie en het aanpassingsvermogen van een synaps.

3.3 Belang

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

Neuronale netwerken in het brein passen zich continu aan door bestaande synaptische verbindingen te versterken of te verzwakken, of door nieuwe verbindingen te maken, of bestaande verbindingen te verbreken. Dit aanpassingsvermogen is een essentiële eigenschap van het brein. In verschillende hersenziektes zijn synaptische verbindingen aangetast, maar de precieze moleculaire mechanismen die hieraan ten grondslag liggen kennen we (nog) niet. Onze kennis van de specifieke signalen die ervoor zorgen dat synapsen veranderen is zeer beperkt. Wij gebruiken nieuw ontwikkelde technieken om specifieke synapsen of specifieke moleculen te manipuleren en te visualiseren in levend hersenmateriaal. Ons onderzoek levert kennis op van de moleculaire processen die plaatsvinden tijdens de vorming en veranderingen van synapsen en van de signalen die deze processen reguleren. Deze kennis levert belangrijke informatie op die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen of behandelmethoden voor hersenziektes waarbij synaptische verbindingen verstoord zijn, zoals bijvoorbeeld autisme of de ziekte van Alzheimer.

Samengevat, ons onderzoek is belangrijk omdat het fundamenteel inzicht oplevert in de mechanismen die synapsvorming en plasticiteit reguleren en in de processen die plaatsvinden als neuronale netwerken in het brein zich aanpassen, zoals dat gebeurt tijdens leren, in reactie op een beschadiging (bijvoorbeeld herseninfarct of trauma), of in specifieke hersenziektes.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In hersenplakken van transgene muizen (waarin specifieke cellen gekleurd zijn) volgen we de veranderingen van individuele (meestal inhibitoire) synapsen met een combinatie van drie onderzoeksmethodes: live imaging, electrofysiologie en immunokleuringen. We testen hoe verschillende aspecten van deze synapsen gereguleerd worden door kandidaat signaal eiwitten en moelcualire pathways. Manipulatie van een kandidaat pathway gebeurt met behulp van specifieke farmacologische blokkers (bijvoorbeeld blokkers van specifieke receptoren of kinases of andere enzymen) of via virale modulatie van eiwitexpressie in hersencellen (overexpressie van gelabelde eiwitten of knock-down van endogene eiwitten). We vergelijken synaptische parameters (bijvoorbeeld synapsvorming, synaptische sterkte, dynamische eigenschappen) in controle en gemanipuleerde hersenplakken. We bestuderen welke signalen tijdens de vorming en plasticiteit van inhibitoire synapsen van het axon naar de dendriet gestuurd worden (bijvoorbeeld via GABA release, of via adhesiemoleculen zoals neurexins) en welke signalen van de dendriet naar het axon een rol spelen (bijvoorbeeld retrograde signalen zoals BDNF, NO of endocannabinoïden). Hieronder volgt een korte beschrijving van de verschillende onderzoeksstappen.

1. Selecteren van kandidaat pathways

Selectie van kandidaat eiwitten of signaal pathways gebeurt op basis van literatuur en eerdere experimentele resultaten uit onze eigen groep. Behalve voor eventuele pilot experimenten, waarin bijvoorbeeld een nieuw antilichaam getest wordt, zijn voor deze stap geen dieren nodig.

2. Effect op (inhibitoire) synapsen

We gebruiken een combinatie van drie onderzoeksmethodes (live imaging, electrofysiologie en immunokleuringen) om de rol van kandidaat eiwitten signaal pathways te onderzoeken. Het kandidaat pathway wordt gemanipuleerd met behulp van specifieke farmacologische blokkers (bijvoorbeeld blokkers van specifieke receptoren of kinases of andere enzymen) of via virale modulatie van eiwitexpressie (overexpressie van gelabelde eiwitten of knock-down van endogene eiwitten). We vergelijken synaptische parameters (bijvoorbeeld synapsvorming, synaptische sterkte, dynamische eigenschappen) in controle en gemanipuleerde cellen.

Live imaging: We visualiseren inhibitoire axonen in levende hersenplakken en bestuderen het dynamische gedrag van hun synapsen (onder de microscoop te zien als verdikkingen in het axon). We kwantificeren hoeveel nieuwe synapsen er gevormd worden, hoeveel er verdwijnen, hoeveel er stabiel blijven en welke veranderingen er opgetreden zijn. Na een baseline periode, activeren of blokkeren we een bepaalde signaalcascade en we bestuderen hoe deze manipulatie het dynamische gedrag van de synapsen beïnvloedt. Zo kunnen we signalen identificeren die synapsen stabiliseren (meer synapsvorming), of destabiliseren (meer verlies van synapsen), of veranderen (morfologische veranderingen).

Immunokleuring: Na afloop van deze live experimenten fixeren we de hersenplakken en bepalen dan met behulp van een immunokleuring of bepaalde eiwitten wel of niet aanwezig zijn in de synapsen. De kracht van onze aanpak is dat wij dit kunnen doen voor vele synapsen tegelijk, waarbij elke synaps individueel geanalyseerd wordt. Dus we correleren de aanwezig- of afwezigheid van bepaalde eiwitten met de dynamische eigenschappen van elke synaps (stabiel, niet-stabiel, net gevormd, etc.).

In sommige gevallen bekijken we het effect van bepaalde signaalmoleculen of synaptische eiwitten zonder de live imaging.

In andere live imaging experimenten labelen we specifieke eiwitten met behulp van een fluoresceent label (tot expressie gebracht via een virus) en bestuderen wanneer zij arriveren in een nieuw gevormd inhibitoir synaps en hoe dit beïnvloed wordt als er specifieke signaalcascades gemanipuleerd worden.

Electrofysiologie: Om te onderzoeken hoe signaalmoleculen (zoals Sema4D, Met, endocannabinoïden, amyloid β etc.) de functie van inhibitoire synapsen beïnvloeden, maken we gebruik van electrofysiologie. In deze experimenten meten we de kleine stroompjes die inhibitoire synapsen doorgeven (zogenaamde 'inhibitory postsynaptic currents', IPSCs) met behulp van de patch clamp techniek. We meten hoe IPSCs veranderen als een signaal cascade wordt geactiveerd of geblokkeerd tijdens de meting (bath application), of als het voor 1 of 2 dagen wordt gemanipuleerd voorafgaand aan de experimenten. In voorkomende gevallen worden verschillende experimenten, waarbij verschillende aspecten van pathways onderzocht worden, met behulp van hersenweefsel van dezelfde dieren uitgevoerd.

3. Effect op dendritische signalen

In gekleurde dendrietten (label wordt aangebracht via een patch pipet of dmv virale expressie) identificeren we excitatoire en inhibitoire synapsen en bestuderen we hun interacties via combinaties van calcium imaging, twee-foton microscopie en/of electrofysiologie. Het effect van synaptische activatie wordt gemeten door een combinatie van electrofysiologie, calcium imaging en twee-fotonen microscopie. De membraanpotentiala van de postsynaptische dendriet wordt gecontroleerd door stroominjecties via een patch pipet, waardoor bijvoorbeeld een langdurige depolarisatie of een reeks snelle actiepotentialen kunnen worden opgewekt. We gebruiken laserlicht (aangestuurd via de microscoop) of een extracellulaire stimulatie electrode om specifieke synapsen en/of hersencellen te activeren. We meten de dendritische calcium signalen en/of synaptische stroompjes tijdens synaptische activatie en we bestuderen hoe niet-geactiveerde synapsen reageren op deze dendritische activiteit. Vervolgens blokkeren of activeren we signaalcascades waarvan we vermoeden dat ze een rol spelen (zoals via NMDA receptoren, endocannabinoids, BDNF, specifieke ion kanalen etc.) en bestuderen we hoe dit het effect beïnvloed.

4. Nauwkeurige lokalisatie van kandidaat- en gerelateerde moleculen

Het is belangrijk om precies te weten waar de verschillende signaalmolekulen gelokaliseerd zijn. Bijvoorbeeld, hetzelfde eiwit zal andere signalen doorgeven als het aan de pre- of aan de postsynaptische kant van een synaps zit. Een belangrijk onderdeel van het identificeren en ontrafelen van signaalcascades in synapsen is daarom het bepalen van de precieze moleculaire samenstelling van de relevante celstructuren op nanometerschaal. Hiervoor ontwikkelen we nieuwe microscooptechnieken (onder andere STED, STORM en PALM microscopie) die het mogelijk maken om te bepalen of belangrijke moleculen aan de pre- of postsynaptische kant, of net naast de eigenlijke synaps gelokaliseerd zijn. We ontwikkelen nieuwe microscooptechnieken die het mogelijk maken om de nanostructuur van synapsen en hun omgeving te bepalen. Hiervoor labelen we specifieke eiwitten met behulp van immunohistochemie of via virale modulatie en gebruiken we verschillende vormen van superresolutie microscopie. Dit zijn technologisch complexe experimenten die veel optimalisatie vergen van de precieze labeling-, fixatie- en imagingmethode van het hersenmateriaal.

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

In onze onderzoeksgroep hebben we in de afgelopen jaren een unieke methode ontwikkeld om met behulp van geavanceerde microscopie veranderingen in inhibitoire en excitatoire synapsen te volgen in gekleurde hersencellen in levende hersenplakken. Ons onderzoek wordt gefinancierd door middel van gehonoreerde onderzoeksvorstellen.

Synapsvorming en synaptische plasticiteit

Met onze live imaging experimenten hebben wij aangetoond dat het signaalmolekuul Sema4D nieuw gevormde terminals binnen enkele tientallen minuten stabiliseren via het intracellulaire actine skelet (Frias et al., 2017). Wij hebben bovendien laten zien dat de Met-receptor hierin een belangrijke rol speelt. Dit is interessant, omdat Met een bekende autisme-risico factor is, waarvan nog niet eerder een link met inhibitoire synapsen was aangetoond. Dit onderzoek laat zien dat inhibitoire veranderingen heel belangrijk zijn in het aanpassingsvermogen van het brein. Dit is een voorbeeld van hoe fundamenteel onderzoek naar moleculaire processen nieuwe inzichten kan opleveren in het ontstaan van hersenziekten.

In de komende jaren gaan we de rol van Met in inhibitoire synapsen verder onderzoeken en willen we verder begrijpen hoe Sema4D het actine skelet in het axon verandert zodat nieuwe synapsen gevormd worden. Ons onderzoek toont aan dat de verandering in actine in het axon een van de eerste stappen in de synapsvorming is. In vervolgentoelagen willen we bepalen in welke volgorde eiwitten worden gerecruiteerd tijdens de vorming van een inhibitoire synaps. Hiervoor gaan we bestuderen op welk moment tijdens de vorming van inhibitoire synapsen specifieke synaptische eiwitten in de nieuwe synaps verschijnen. We willen bijvoorbeeld achterhalen of de active zone (een presynaptische moleculaire specialisatie met onder andere Bassoon) gevormd wordt voordat de postsynaptische specialisatie (gephyrin, collybistin, neuroligin, GABA_ARs) compleet is. Ook willen we achterhalen op welk moment synaptische adhesiemoleculen zoals neuroligin en neuroligins in de nieuwe synaps verschijnen. In een andere vervolgstudie willen we bestuderen hoe presynaptische G-gekoppelde eiwitten de vorming van inhibitoire synapsen beïnvloedt. Het is bekend dat inhibitoire synapsen verschillende G-

gekoppelde eiwitten bevatten, zoals receptoren voor endocannabinoïden, dopamine, GABA en glutamaat. Voor sommige van deze receptoren is bekend dat ze de werking van inhibitoire synapsen kunnen versterken of verzwakken, maar onze resultaten uit de Sema4D studie suggereert dat dezelfde cascades ook synapsvorming zou kunnen beïnvloeden. Wij doen live imaging studies om te bepalen hoe de dynamische eigenschappen van inhibitoire synapsen veranderen als gevolg van deze signalen (live imaging en immunokleuringen).

We bestuderen ook signaal cascades waarvan bekend is dat die een rol spelen in bepaalde hersenziektes. Een voorbeeld hiervan is onze studie naar de effecten van amyloid β , een eiwit dat een belangrijke rol speelt in het beginstadium van de ziekte van Alzheimer, op de synaptische stroompjes IPSCs. Wij hebben aanwijzingen dat inhibitoire cellen beïnvloed worden door amyloid β , waardoor de balans tussen stimulerende en remmende synaptische signalen ontregelt en de informatieverwerking in het brein verstoord wordt. We meten hoe IPSCs veranderen als amyloid β wordt toegevoegd tijdens de meting (bath application), of als het voor 1 of 2 dagen wordt toegevoegd aan de gekweekte hersenplakken. Deze methode gebruiken we ook voor ons onderzoek naar andere signaalmoleculen (zoals Sema4D, Met, endocannabinoïden, etc.).

Dierexperiment: dissectie van pups en volwassen dieren

Synaptische interacties in dendrieten

We zijn geïnteresseerd in de interacties tussen verschillende synapsen in de dendriet, of tussen synaptische signalen en dendritische ion kanalen. [REDACTED] in het verleden laten zien dat de impact van een individuele inhibitoire synaps heel lokaal is, zowel in tijd als in afstand (Müllner et al., 2015). Uit deze studie blijkt dat de precieze plek op de dendriet een belangrijke parameter voor inhibitoire synapsen is. Een vervolgstudie richt zich daarom op identificatie van de dendritische signalen die de plek van inhibitoire synapsvorming bepalen. In dit project testen we de hypothese dat excitatoire activiteit (dus van excitatoire synapsen) bepaalt waar en wanneer nieuwe inhibitoire synapsen gevormd worden. We hebben aanwijzingen dat excitatoire synaptische activiteit in dendrieten ervoor zorgt dat een signaalstof (bijv. BDNF, NO of endocannabinoïden) uitgezonden wordt, die vervolgens de vorming en/of plasticiteit van inhibitoire synapsen op dezelfde dendriet beïnvloedt. Wij onderzoeken onder welke omstandigheden deze signaalstoffen afgegeven worden en

In een andere vervolgstudie bestuderen we hoe inhibitoire synaptische signalen beïnvloed worden door dendritische ionkanalen en vice versa. De opening en sluiting van voltage-afhankelijke ionkanalen dragen bij tot een niet-lineaire integratie van synaptische signalen en kunnen daarmee de postsynaptische impact van synapsen versterken of verzwakken. Het is dus belangrijk om te achterhalen welke

ionkanalen er in de dendrieten aanwezig zijn en welke invloed zij hebben op dendritische en synaptische signalen. We bestuderen de bijdrage van verschillende soorten K^+ en Na^+ kanalen (bijv. A- en H-type kanalen) en Ca^{2+} kanalen (bijv. T- en L-type) op dendritische inhibitie.

Dierexperiment: dissectie van pups en volwassen dieren

Superresolutie microscopie in hersenplakken

Een belangrijk onderdeel van het identificeren en ontrafelen van signaalcascades in synapsen is het bepalen van de precieze moleculaire samenstelling van de relevante celstructuren op nanometerschaal. In eerdere studies [REDACTED] laten zien dat sommige synaptische eiwitten nanoclusters vormen die belangrijk zijn voor de synaptische functie (MacGillavry et al. 2016). De precieze positie in de synaps bepaalt met welke andere eiwitten interacties kunnen worden aangegaan en eiwitclustering beïnvloedt de signaalcascade. We bestuderen de nanoverdeling van onder andere metabotrope ion kanalen (bijv. mGluR en GABA_BR), adhesiemoleculen (bijv. neurexins, neuroligins), scaffoldmoleculen (bijv. gephyrin, shank, homer) en presynaptisch actine. Daarnaast bekijken we ook hoe ionkanalen (zie hierboven) verdeeld zijn in dendrieten, een belangrijke factor in de integratie van synaptische signalen.

Dierexperiment: dissectie van pups en volwassen dieren

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

Onze belangrijkste focus ligt op het ontrafelen van de moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van inhibitoire synapsen. Over het algemeen beginnen we met het bestuderen van de rol van een kandidaatpathway door veranderingen in inhibitoire synapsen te meten met behulp van twee-foton microscopie en/of electrofysiologie tijdens manipulatie van het kandidaatpathway. Door nauwkeurige analyse van de onderzoeksresultaten bepalen we dan welk specifiek aspect er veranderd is

(bijvoorbeeld: synapsen vertonen verhoogde/verminderde stabiliteit, synapsen zijn sterker/zwakker, of ze hebben een veranderde moleculaire samenstelling). We gebruiken onze kennis van deze specifieke processen voor het ontwerp van vervollexperimenten. Als we bijvoorbeeld een effect vinden van een kandidaat pathway waarvan bekend is dat dit in dendrieten geactiveerd kan worden (bijvoorbeeld we vinden dat endocannabinoiden de stabiliteit van inhibitoire synapsen beïnvloeden), dan zullen we in vervollexperimenten bestuderen hoe activiteit in postsynaptische dendrieten presynaptische inhibitoire synapsen reguleert. Als we een effect vinden op de presynaptische sterkte (verandering van release probability, of aantal vesicles) zullen we vervolgens interacties met presynaptische eiwitten verder onderzoeken door deze eiwitten te manipuleren. Van sommige kandidaat molekulen zal de lokalisatie al bekend zijn en zal ons onderzoek vooral gericht zijn om de precieze signaal cascade te identificeren. Van andere kandidaten is misschien de cascade wel bekend, maar was nog niet eerder aangetoond dat deze eiwitten aanwezig zijn in of rond synapsen. Dan zal ons onderzoek erop gericht zijn om deze eiwitten zo nauwkeurig mogelijk te lokaliseren. Omdat er nog niet veel bekend is over de signaalcascades die inhibitoire synapsen reguleren, zijn negatieve resultaten (kandidaat X heeft geen effect) ook belangrijk.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Ontrafelen van de fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen
2	-
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800				
1.2	Vul de naam van de Instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td><i>ontrafelen van fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen</i></td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	<i>ontrafelen van fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen</i>
Volgnummer	Type dierproef					
1	<i>ontrafelen van fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen</i>					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project worden fundamentele cellulaire en moleculaire processen bestudeerd die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synaptische verbindingen. Deze kennis is essentieel voor het begrijpen van het aanpassingsvermogen van neurale netwerken, zoals dat gebeurt tijdens leren en geheugen, maar ook in het zieke brein. De kennis die dit project oplevert dient er uiteindelijk voor om nieuwe behandelingsmethoden te ontwikkelen voor hersenziektes en -aandoeningen.

Om de moleculaire mechanismen van synapsvorming en synaptische plasticiteit te ontrafelen, doen we in vitro en ex vivo experimenten, waarin we synaptische verbindingen meten met geavanceerde microscopische en electrofysiologische technieken terwijl specifieke signaal pathways worden geactiveerd of gehinibeerd in hersenplakken. Voor deze experimenten zijn hersenplakken essentieel, omdat in dit intact hersenmateriaal de synapsen in hun natuurlijke omgeving bestudeerd worden. In een meer gereduceerd modelsysteem, zoals bijvoorbeeld primaire kweken of cellijnen, zijn de processen die wij bestuderen verstoord, of (deels) afwezig. Dieren worden gedood en hersenmateriaal wordt verwijderd en geprepareerd voor wetenschappelijke experimenten. Afhankelijk van de onderzoeksvraag zullen we dieren (wildtype/transgeen) van verschillende leeftijden gebruiken. Voor het maken van gekweekte hersenplakken gebruiken we dieren van 5-8 dagen oud. Voor het maken van acute hersenplakken gebruiken we volwassen dieren.

Het verkregen hersenmateriaal wordt gebruikt voor:

1. Electrofysiologie en microscopie in organotypische kweken (gekweekte hersenplakken)

2. Electrofysiologie en microscopie in acute hersenplakken
3. Immunohistochemie, in situ hybridisatie, in sommige gevallen na tissue clearing
4. Biochemische essays (western blots, ELISA, FACS, Microarray, RNA/ DNA/ eiwit extractie)
5. Manipulatie van cellen (dmv virale of plasmide-gedreven gen expressie), met daaropvolgende analyse zoals hierboven genoemd

Uitleesparameters zijn (onder andere): aantal synapsen met/zonder bepaalde eiwitten, ontwikkelingsstadium van synapsen (nieuw gevormd, verloren, transient, stabiliserend, destabiliserend, stabiel), efficiëntie van transmissie (release probability, amplitude en frequentie van miniatuur, spontane en/of evoked IPSCs), plasticiteit op korte en lange termijn, chloride omkeerpotentiaal, (niet-)lineaire integratie van synaptische signalen.

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

Alle procedures bestaan uit het doden van een dier volgens de Richtlijn Annex IV.

De dieren worden gedood door middel van decapitatie. Deze procedure duurt enkele seconden.

Hersenen worden verwijderd en geprepareerd voor experimenten. Snelle decapitatie is noodzakelijk om de kwaliteit van het levend hersenweefsel te waarborgen.

In sommige gevallen is het nodig om (onder anesthesie) perfusie toe te passen voorafgaand aan de decapitatie. Perfusie via het hart met ijskoude ACSF is noodzakelijk om de kwaliteit van het hersenmateriaal voor electrofysiologie studies in oude, volwassen dieren te waarborgen. Perfusie met een fixatief oplosmiddel is noodzakelijk voor het verkrijgen van gefixeerd hersenmateriaal voor immunokleuringen. Bij deze procedure is het dier 5-15 minuten onder anesthesie voordat het gedood wordt.

De dieren worden dagelijks gecheckt op verschillende parameters (algemene indruk, grootte, groei, vacht, gedrag, klinische verschijnselen) zoals beschreven in de guidelines 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. Humane eindpunten zijn beschreven voor experimenten.

Het materiaal dat geïsoleerd wordt is voornamelijk hersenmateriaal, maar ander weefsel kan ook verwijderd worden voor nader onderzoek naar eiwit- of genexpressie.

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

Het aantal dieren is gebaseerd op onze jarenlange ervaring en we passen deze getallen steeds aan de wetenschappelijke vraag. Bijvoorbeeld, in sommige experimenten is het nodig dat er een specifiek type cel gemanipuleerd wordt, waardoor er maar een beperkt aantal hersenplakken (of alleen van een specifiek hersengebied) gebruikt kan worden. Voor andere experimenten gelden deze beperkingen niet, en kan al het hersenmateriaal gebruikt worden.

In sommige gevallen zullen we eerst een reeks pilotexperimenten uitvoeren om de experimentele variatie in de data te bepalen en bepalen we met behulp van een statistische analyse hoeveel dieren we per groep nodig hebben.

B. De dieren

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

In de meeste gevallen zullen we (wildtype en transgene) muizen gebruiken. In een deel van onze experimenten is het nodig om ratten te gebruiken, omdat de gebruikte virusconstructen specifiek zijn voor de rat-isoform van eiwitten. Ratten en muizen zijn veel gebruikte en gevalideerde modellen voor onderzoek naar de neurobiologische processen die wij bestuderen (synapsvorming en synaptische plasticiteit). Veel van de signaalmolekulen en pathways in knaagdieren komen overeen met die in humane hersenen.

De schatting van het aantal dieren is voornamelijk gebaseerd op onze ervaring van de afgelopen 5 jaar. De muizen worden in huis gefokt, of komen van gekwalificeerde leveranciers van proefdieren, of van andere onderzoeksinstituten. Het ongerief van de fok is licht, omdat we muizen gebruiken waarin bepaalde cellen fluorescent of anderszins gelabeld zijn. Deze labels zijn belangrijk voor onze experimenten, maar hebben geen effect op het welzijn van de muizen. Op de werkprotocollen zullen we de specifieke leeftijd vermelden waarop de ratten en muizen gebruikt worden.

We schatten het totale aantal dieren op 2080 muizen (*mus musculus*, van P5 tot volwassen) en 520 ratten (*rattus norvegicus*, van P5 tot volwassen).

We gebruiken dieren van beide geslachten voor de gekweekte hersenplakken. Geslachtshormonen beïnvloeden synaptische transmissie en synapsvorming en daarom beperken we ons in sommige studies met acute hersenplakken tot mannetjes om variatie vanwege de vrouwelijke hormooncyclus te voorkomen.

In de aanvraag beschrijven we hoe we kandidaat moleculen en pathways selecteren voor onze studies. Het aantal kandidaten en de precieze assays bepalen het aantal benodigde dieren. Onze experimenten in het verleden laten zien dat we maximaal 5 muizen en 2 ratten per week (dus 260 muizen en 104 ratten per jaar) gebruiken voor experimenten in gekweekte hersenplakken. Daarnaast gebruiken we maximaal 3 muizen per week (dus 156 per jaar) voor experimenten in acute hersenplakken. Voor de komende 5 jaar verwachten wij dus maximaal 2080 muizen ($=5 \times (260 + 156)$) en 520 ratten ($=5 \times 104$) te gebruiken. Voor specifieke experimenten maken we specifieke berekeningen, zoals hieronder beschreven.

Gekweekte hersenplakken:

Per muis kunnen we 5 tot 10 hersenplakken kweken, die we gedurende de 2-3 weken na decapitatie van de muis gebruiken voor experimenten.

Fysiologie studie (electrofysiologie of imaging): Voor het testen van een kandidaat pathway in bijvoorbeeld het reguleren van synapsvorming hebben we tenminste 10 hersenplakken per experimentele groep nodig. Voor 2 groepen (bijvoorbeeld control vs blocker) hebben we dus in totaal 20 hersenplakken nodig.

Experimenten worden altijd gepaard uitgevoerd (controle en experimentele groep in dezelfde 'batch' slices) om experimentele variatie tussen muizen en kweken te minimaliseren. Om te voorkomen dat er bias ontstaat, worden er liefst voor elke gepaard experiment (1 controle en 1 blocker) hersenplakken van een andere muis gebruikt, en er worden niet meer dan 2 experimenten per muis gedaan. Er zijn dus 5 tot 10 muizen voor een studie nodig (gemiddeld 8).

Immunohistochemie studie: Voor het testen van een kandidaat pathway met behulp van immunokleuring gebruiken we 3 hersenplakken per experimentele groep en worden de hersenplakken van alle groepen tegelijk verwerkt. De kleuring wordt 3-5 maal herhaald om variatie tussen kleuringen te minimaliseren. Dus voor een experiment met 2 groepen (bijvoorbeeld control vs blocker) hebben we 6 hersenplakken per dier nodig en in totaal 3-5 dieren (gemiddeld 4).

Verschillende onderzoekers voeren verschillende studies parallel uit en de gekweekte hersenplakken van 1 dier kunnen voor 2 tot 3 parallele studies gebruikt worden. In sommige gevallen, als er specifieke transgene muizen of ratten nodig zijn, kunnen de hersenplakken niet gebruikt worden door andere onderzoekers. Overige hersenplakken worden gebruikt voor het testen van nieuwe antilichamen, drugs of andere pilotexperimenten.

Acute hersenplakken:

Per dier kunnen we (afhankelijk van het hersengebied) 2-10 hersenplakken maken die we gedurende 4-8 uur kunnen gebruiken voor electrofysiologie metingen.

Voor het testen van een kandidaat pathway voor bijvoorbeeld het reguleren van synaptische plasticiteit hebben we 6-10 dieren nodig per experimentele groep. Voor een studie met 2 groepen zijn dus 12-20 muizen nodig (gemiddeld 15.6).

We maken de volgende schatting van ons jaarlijks proefdiergebruik:

- maximaal 20 fysiologiestudies en 25 immuno-studies in gekweekte hersenplakken van muizen, waarvoor 260 ($=20 \times 8 + 25 \times 4$) muizen nodig zijn.
- maximaal 10 studies in acute hersenplakken van muizen, waarvoor 156 ($=10 \times 15.6$) muizen nodig zijn.
- maximaal 8 fysiologiestudies en 10 immuno-studies in gekweekte hersenplakken van ratten, waarvoor 104 ($=8 \times 8 + 10 \times 4$) ratten nodig zijn.

Dit zijn in totaal per jaar: 416 ($=260 + 156$) muizen en 104 ratten
en in 5 jaar: 2080 ($=5 \times 416$) muizen en 520 ($=5 \times 104$) ratten

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De procedures die hier beschreven zijn zijn gebaseerd op wetenschappelijke literatuur en op ervaring met dierexperimenten. Deze experimenten worden in de hele wereld op dezelfde wijze uitgevoerd, waardoor de resultaten uitgewisseld en geëxtrapoleerd kunnen worden tussen onderzoeksgroepen. Waar mogelijk zullen experimenten uitgevoerd worden in silico (computermodellen) voordat een dierproef uitgevoerd wordt. Als er een alternatief mogelijk is zonder het gebruik van dieren om de wetenschappelijke vraag te beantwoorden, is dat altijd onze eerste keus.

Als het mogelijk is worden nesten en hersenplakken gedeeld met meerdere onderzoekers om zo surplus tot een minimum te beperken. Voor elke onderzoeksvraag zullen de experimenten achter elkaar uitgevoerd worden, terwijl verschillende onderzoekers in parallel verschillende onderzoeksvragen beantwoorden. Op deze manier wordt er optimaal gebruikt gemaakt van het hersenmateriaal. Indien mogelijk, wordt ander materiaal (bijv. van andere organen) gedeeld met andere onderzoekers.

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

In sectie 2A is beschreven hoe de dieren gedood worden. Dit zal altijd worden uitgevoerd door ervaren en bedreven onderzoekers. Decapitatie wordt snel (enkele seconden) uitgevoerd zodat angst en pijn lijden minimaal is. Voor volwassen dieren wordt anesthesie (isofluraan) toegepast tijdens de procedure. Bij jonge pups is anesthesie met isofluraan of koeling niet mogelijk en levert verdooving meer stress op dan snelle decapitatie. Daarom wordt voor pups decapitatie zonder verdooving toegepast.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien. De dieren ondergaan normale behuizing tot aan hun dood.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

N.v.t.

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

N.v.t.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Dieren zullen licht ongerief ervaren gedurende de procedures zoals beschreven in sectie A.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het doel van het experiment is het doen van onderzoek op het hersenmateriaal dat uit de dieren wordt verwijderd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.863.013
2. Titel van het project : Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen
3. Titel van de NTS : Vorming en veranderingen van remmende hersenverbindingen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 28-08-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 06-09-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 12-09-2017/03-10-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 18-10-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 12-09-2017
- Datum antwoord: 03-10-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC geeft u ter overweging mee de tekst onder 3.4.2 zodanig aan te passen dat nog duidelijker naar voren komt dat de verschillende onderzoeksvragen terecht in één project zijn ondergebracht. Daarbij kan als aanvullend argument ook vermeld worden dat in voorkomende gevallen de verschillende experimenten met behulp van weefsel uit dezelfde dieren uitgevoerd kunnen worden.
Er duidelijker benadrukt in de projectaanvraag.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Veel andere onderzoekers leggen pups op ijswater voorafgaand aan decapitatie, zodat het bewustzijnsniveau verlaagd wordt. De reden daarvoor is de aanname dat de hersenen van pasgeboren pups nog dermate goed bestand zijn tegen zuurstofgebrek dat er mogelijk nog enige tijd sprake zou kunnen zijn van bewustzijn na decapitatie. De DEC vraagt zich af waarom u niet ook voor deze aanpak heeft gekozen. Graag toelichten.
Koeling voorafgaand aan decapitatie werkt goed bij embryo's, maar bij pups duurt deze procedure erg lang en levert bovendien veel stress op. Vandaar onze keuze om te decapiteren zonder verdoving. Dit is toegelicht bij D.
- B. Dieren: In de vetgedrukte zin staat 'het totale aantal muizen'. Dit zou 'het totale aantal dieren' moeten zijn. Graag aanpassen.
Dit is aangepast.
- B. Dieren: De DEC wijst u erop dat het bij gebruik van jonge pups aan te raden is om 1-2 pups bij de moeder te laten, omdat het moederdier ongerief ervaart als alle pups worden weggehaald en dan meegeteld moet worden in het aantal te gebruiken proefdieren.
Dit doen wij in de praktijk zoveel mogelijk. Deze procedure staat beschreven in het werkprotocol en niet in deze aanvraag, dus ik heb niets veranderd.

Niet-Technische Samenvatting

- Algemeen: Op verschillende punten in de tekst worden alleen muizen genoemd. De DEC verzoekt u hier ook de ratten te vermelden.
Dit is aangepast.
 - 4.1 en 4.2: De DEC merkt op dat u hier spreekt over gebruik van menselijke cellen, terwijl dit in de projectaanvraag niet genoemd wordt. De DEC verzoekt u het gebruik van menselijke cellen ook op te nemen in projectbeschrijving en onder punt D in de bijlage, dan wel te verwijderen uit de NTS wanneer experimenten met cellen van humane oorsprong geen onderdeel vormen van het project.
Dit is verwijderd uit de NTS.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

Hersencellen communiceren met elkaar met behulp van synapsen. Synaptische verbindingen tussen hersencellen liggen niet vast, maar zijn voortdurend aan veranderingen onderhevig. Synapsen kunnen sterker/zwakker en gevormd/verwijderd worden. Veranderingen in synapsen spelen een belangrijke rol in leer- en aanpassingsprocessen, maar ook bij hersenziekten zoals epilepsie, autisme, schizofrenie en de ziekte van Alzheimer. Er wordt onderscheid gemaakt tussen excitatoire en inhibitoire synapsen. Over excitatoire synapsen (het overgrote deel van de synapsen in de hersenen) is al veel bekend, maar er zijn steeds meer aanwijzingen dat juist de minder vaak voorkomende inhibitoire synapsen een cruciale rol spelen in het leer- en aanpassingsvermogen van het brein. De aanvrager wil daarom met behulp van het voorliggende project – en aan de hand van vier helder beschreven subdoelen – in kaart brengen welke moleculen en signaalroutes een rol spelen bij de vorming, aanpassing en functie van inhibitoire synapsen. De relatie tussen het hoofddoel en de vier subdoelen komt overeen met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontrafelen van mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van inhibitoire synapsen met behulp van fundamenteel onderzoek met hersenweefsel afkomstig van muizen en ratten. Het uiteindelijke doel van het project is om met behulp van de verkregen resultaten bij te dragen aan een beter begrip van de neuronale aanpassingen in de hersenen die ten grondslag liggen aan leerprocessen, reacties op

beschadiging (zoals na een herseninfarct of trauma) en het ontstaan van verschillende hersenziekten (zoals autisme en de ziekte van Alzheimer). Met deze fundamentele kennis is het in de toekomst wellicht mogelijk nieuwe behandelmethoden voor hersenaandoeningen te ontwikkelen. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de toekomstige doelgroep (patiënten met een hersenaandoening) en het onderzoeksveld. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn en hun intrinsieke waarde (de intrinsieke waarde van de dieren wordt aangetast doordat ze gedood worden ten behoeve van wetenschappelijk onderzoek). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: het mogelijk beschikbaar komen van doeltreffende therapeutische behandelingen die ontwikkeld kunnen worden met behulp van uit dit project voortkomende fundamentele kennis. De morele waarden die voor het onderzoeksveld worden bevorderd zijn: uitbreiding van kennis met betrekking tot inhibitorische synapsen
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu onnodige negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten (dit is door de aanvrager zeer helder uiteengezet) en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. De jarenlange kennis en ervaring en de toepassing van state-of-the-art technieken dragen in sterke mate bij aan de haalbaarheid van het voorliggende project.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In de aanvraag is duidelijk uiteengezet met behulp van welke onderzoeksstappen en – technieken de onderzoeksvragen behorende bij de vier subdoelen beantwoord zullen worden. De DEC is van mening dat de vier subdoelen logisch met elkaar samenhangen en terecht onderdeel zijn van een en hetzelfde project. Dankzij de combinatie van de verschillende experimenten – die deels in hersenweefsel van dezelfde dieren zullen worden uitgevoerd – is het mogelijk om een goed beeld te krijgen van de moleculen en signaalroutes die een rol spelen bij de vorming, aanpassing en functie van inhibitorische synapsen.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle dieren uit bijlage 1 (zowel de pups als de volwassen dieren) worden gedood door decapitatie. Een aantal dieren wordt voorafgaand aan de decapitatie onder anesthesie geperfundeerd. Voor alle dieren geldt dat zij maximaal licht ongerief ervaren.
12. Naar de mening van de DEC wordt de integriteit van de dieren niet aangetast door de voorgenomen experimenten.
13. De aanvrager gaat er in de ogen van de DEC terecht vanuit dat zich gedurende de dierproef geen omstandigheden zullen voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De deels nog op te helderen interacties tussen synapsen en hun omgeving zijn dusdanig complex, dat deze nog niet volledig in vitro of in silico nagebootst kunnen worden. Hierdoor blijft het gebruik van intact hersenmateriaal van proefdieren noodzakelijk. Wel wordt daar waar mogelijk relevant vooronderzoek verricht met behulp van in vitro experimenten. En voor de interpretatie van data (de gevolgen van synaptische veranderingen voor de functie van hersencellen) maken de onderzoekers gebruik van computermodellen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De aanvrager heeft in de bijlage duidelijk

uiteengezet hoe de berekening van het benodigde aantal dieren tot stand gekomen is. Daarbij is ook rekening gehouden met het aantal experimenten dat logistiek gezien haalbaar is. Waar mogelijk worden verschillende experimenten in hersenweefsel van dezelfde dieren uitgevoerd.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen. De aanvrager heeft in reactie op een vraag van de DEC uitgelegd waarom decapitatie van pups zonder voorafgaande plaatsing op ijswater de meest verfijnde methode van doden is.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor experimenten met gekweekte hersenplakken (verkregen uit jonge pups) worden dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet. Voor sommige acute experimenten met hersenplakken (verkregen uit volwassen dieren) worden alleen mannetjes ingezet, omdat de vrouwelijke hormooncyclus tot te veel variatie zou leiden (geslachtshormonen beïnvloeden synaptische transmissie en synapsvorming). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstelling te bereiken, noodzakelijk is om sommige proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden met behulp van ex vivo experimenten die uitgevoerd worden met hersenweefsel afkomstig van ratten en muizen. De dieren worden volgens een passende – en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde – methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft met behulp van fundamenteel onderzoek in hersenweefsel afkomstig van muizen en ratten de mechanismen te ontrafelen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van inhibitoire synapsen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en hun intrinsieke waarde van de gebruikte proefdieren?

2. Er vindt een beperkte aantasting van het welzijn van de proefdieren plaats, met licht ongerief tot gevolg.

Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project eraan bijdragen dat het onderzoeksveld meer inzicht krijgt in de neuronale aanpassingen in de hersenen die ten grondslag liggen aan leerprocessen, reacties op beschadiging en het ontstaan van verschillende hersenziekten. Ook de samenleving zou daar baat bij hebben, omdat het op de lange termijn wellicht mogelijk is om met behulp van deze fundamentele kennis nieuwe behandelmethoden voor hersenaandoeningen te ontwikkelen. De inzet van proefdieren is noodzakelijk om de doelstelling te kunnen bereiken, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat blijkt onder andere uit de keuze om pups niet op ijswater te leggen voorafgaand aan decapitatie, om onnodige stress te voorkomen. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het doel van het voorliggende project een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. Met het oog op de jarenlange kennis en ervaring van de onderzoeksgroep, en het gebruik van state-of-the-art technieken, is het naar de mening van de DEC aannemelijk dat de fundamentele doelstelling van dit project behaald zal worden. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project, en dat de verschillende onderzoeksvragen terecht zijn ondergebracht in één project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is, en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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

AVD1080020173847

Bijlagen

2

Datum 2 november 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 27 oktober 2017. Het gaat om uw project "Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020173847. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

2 november 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020173847

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 november 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020173847

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Associate Professor
Afdeling: Biologie departement, Betafaculteit
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- [x] 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 januari 2018

Geplande einddatum:

1 januari 2023

Titel project:

Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen

Titel niet-technische samenvatting:

Vorming en veranderingen van remmende hersenverbindingen

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

Datum:

2 november 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020173847

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.035,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

 Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

27 oktober 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC

Postbus 80.011

3508 TA UTRECHT



**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

AVD1080020173847

Bijlagen

2

Datum 2 november 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 november 2017

Vervaldatum: 2 december 2017

Factuurnummer: 173847

Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020173847	€ 1.035,00

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.

From: Info-zbo
To: [REDACTED]
Cc: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Subject: vraag bij de behandeling van AVD1080020173847
Date: 04 December 2017 13:02:55

Geachte [REDACTED]

Bij de behandeling van uw aanvraag AVD1080020173847 getiteld: 'Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen', hebben wij nog een aantal vragen. Op welke leeftijd zet u de pups in proef? U beschrijft in de bijlage zowel p=0 als p=5-8.

U beschrijft als dodingsmethode decapitatie, volgens bijlage IV van de Richtlijn kan deze methode alleen worden ingezet wanneer voldoende is onderbouwd dat een andere methode niet geschikt is.

U heeft als doelcategorie 'instand houden van kolonies genetisch gemodificeerde dieren' aangekruist, dit is niet van toepassing op deze aanvraag.

Kunt u de documenten aanpassen wanneer nodig?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

From: [REDACTED]
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Subject: Re: vraag bij de behandeling van AVD1080020173847
Date: 04 December 2017 15:56:53
Attachments: [CCD-aanvraag-projectvergunning.docx](#)
[CCD-bijlage1-beschrijving-dierproeven_FINAL\(CCD\).docx](#)
[CCD-niet-technische-samenvatting_FINAL\(CCD\).docx](#)
[CCD-projectvoorstel_FINAL\(CCD\).docx](#)

Beste [REDACTED]

Hartelijk dank voor je snelle reactie. Hierbij stuur ik je het antwoord op de vragen van de CCD:

1. Op welke leeftijd zet u de pups in proef? U beschrijft in de bijlage zowel p=0 als p=5-8. We gebruiken pups vanaf een leeftijd van 5 dagen. Ik heb de tekst bij B nu aangepast van 'P0 tot volwassen' naar 'P5 tot volwassen'

2. U beschrijft als dodingsmethode decapitatie, volgens bijlage IV van de Richtlijn kan deze methode alleen worden ingezet wanneer voldoende is onderbouwd dat een andere methode niet geschikt is.

Een snelle procedure (decapitatie) is noodzakelijk om de kwaliteit van het levend hersenweefsel te waarborgen voor verder bewerking. Hersenplakken van weefsel van gestresste dieren overleeft niet goed in kweek.

Zoals uitgelegd in de bijlage bij D levert isofluraan anesthesie bij pups meer stress op dan een snelle decapitatie zonder anesthesie. Volwassen dieren worden wel eerst onder anesthesie gebracht. Dit is overlegd met en goedgekeurd door de IvD Utrecht.

3. U heeft als doelcategorie 'instand houden van kolonies genetisch gemodificeerde dieren' aangekruist, dit is niet van toepassing op deze aanvraag.

Ik heb in het projectvoorstel en in de NTS dit kruisje verwijderd.

Ik stuur je de aangepaste formulieren toe. Laat me weten als ik nog iets moet doen.

Groeten,
[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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
AVD1080020173847
Bijlagen
1

Datum 11 december 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 27 oktober 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen" met aanvraagnummer AVD1080020173847. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 27 oktober 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
11 december 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020173847

Nadere vragen aanvrager

Op 4 december 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op de leeftijd van de pups wanneer zij in proef worden genomen, de keuze voor de dodingsmethode en de doelcategorie. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:

11 december 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020173847

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan vorming en plasticiteit van synapsen" met aanvraagnummer AVD1080020173847, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 27 oktober 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 4 december 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 ontrafelen van fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen, zoals ontvangen op 4 december 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 4 december 2017;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 27 oktober 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 december 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Overige opmerkingen
3.4.4.1 ontrafelen van fundamentele cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan de vorming en plasticiteit van synapsen				Humane Eindpunten worden niet verwacht.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / p5-8 en volwassen	2.080	100,0% Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / p5-8 en volwassen	520	100,0% Licht	

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer:
AVD1080020173847

- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD1080020173847

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:
AVD1080020173847

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.

