

expanderen om voldoende materiaal te krijgen voor een experiment niet langer noodzakelijk. Op die manier kan het aantal dierexperimenten worden teruggebracht.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het in stand houden van een uniek panel van humane tumoren t.b.v. onderzoek naar resistentiemechanismen. Het uiteindelijke doel is meer kennis te vergaren over resistentiemechanismen die zich voordoen bij carcinoomen van squameuze cellen (SCC) zodat er een effectievere therapie ontwikkeld kan worden. Dit project beperkt zich tot het in stand houden van een panel van tumorlijnen door in vivo passage in naakte muizen. Het onderzoeken van de resistentiemechanismen en het ontwikkelen van een effectievere therapie zal onder een aparte vergunningaanvraag plaatsvinden. Er is daarom binnen deze aanvraag geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft het belang van het in stand houden van een panel van SCC tumorlijnen voor translationeel onderzoek duidelijk gemaakt. Het is evident dat de huidige therapie voor SCC nog niet toereikend is voor alle patiënten, waardoor er behoefte is aan onderzoek naar resistentiemechanismen die zich voordoen bij deze groep tumoren. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor het onderhavige type tumoren. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals kanker van ondermeer het hoofd/hals gebied, is van groot belang voor de samenleving.
De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
6. De aanvrager zal restanten van tumoren die niet gebruikt worden voor passage en kadavers

volgens de richtlijnen afvoeren. Er zijn daardoor geen nadelige effecten voor het milieu te verwachten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met de *in vivo* passage van deze humane tumorlijnen. Onderzoek met deze tumorlijnen heeft geresulteerd in publicaties in vooraanstaande wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt daarnaast over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
8. De doelstelling van het project is realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Op grond van ervaringen in voorgaande jaren mag gesteld worden dat vaststaat dat de tumorlijnen op de in de aanvraag beschreven wijzen succesvol in stand gehouden kunnen worden. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)*De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De combinatie van alle handelingen en de subcutaan groeiende tumor leidt tot matig ongerief voor alle dieren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven en door de subcutaan groeiende tumor. Het is voor dit project echter niet noodzakelijk om de tumoren zo groot te laten worden dat ze tot een meer dan geringe aantasting van het uiterlijk en het normale gedrag leiden. Voor dit project zullen naakte muizen gebruikt worden, omdat humane tumorcellen in deze dieren kunnen groeien. De integriteit van deze dieren is op het niveau van hun uiterlijk aangetast omdat zij geen vacht hebben. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken

is op basis van ervaring met deze dierproeven ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. Die zijn in overeenstemming met wat in het kankeronderzoek gebruikelijk is. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De humane carcinoma xenograft lijnen groeien alleen in naakte muizen. Met de erkende invriesmethode lukt het niet deze modellen weer te laten groeien op een manier die voldoende overeenkomt met de humane situatie. *Inmiddels zijn 5 hoofdhalstumorlijnen geïdentificeerd die in vitro groeien als sferoiden/organoiden en die succesvol kunnen worden ingevroren en worden ontdooid. Uit de experimenten beschreven in dit wijzigingsverzoek wordt duidelijk of de in vitro groeipatronen voldoende lijken op de in vivo groeipatronen. Bij een positief resultaat kan het aantal lijnen dat in stand wordt gehouden (door in vivo passage) worden teruggebracht. Als er namelijk een relevant groeipatroon is, dan kan één van de lijnen uit het panel worden vervangen door deze nieuwe lijn. Een experiment met deze nieuwe lijn kan vanuit de diepvries worden opgestart, waardoor er minder dieren nodig zijn voor in stand houding en voor expansie (geen onderdeel van deze vergunning).*
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee de tumorlijn in stand gehouden kan worden. Door telkens te controleren of de tumorlijn nog voldoet aan de karakteristieken wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. *Voor de voorgestelde wijziging worden 80 extra dieren gevraagd, waardoor het totaal aantal dieren waarop deze vergunning betrekking heeft stijgt van 960 naar 1040. Het aantal dieren voor de voorgestelde wijziging is gebaseerd op een realistische schatting van het aantal dieren en passages dat nodig is om een goed beeld te krijgen van eventuele verschillen tussen de in vitro en de in vivo groeiende tumoren.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er wordt adequate pijnbestrijding toegepast voor de handelingen waarvoor dit is vereist. Het aantal keren dat een dier bijkomt uit anesthesie is tot het minimum beperkt. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven opzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Wanneer de tumoren een bepaalde grootte bereikt hebben, is het noodzakelijk de tumoren uit te nemen en door te zetten in een volgende generatie muizen. De muizen in leven laten na het uitnemen van de tumor dient geen redelijk doel en leidt slechts tot onnodig extra leed voor de dieren. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen). *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De wijziging is ten dele verwerkt in de NTS.*

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het in standhouden van zes humane carcinoma xenograft lijnen en het karakteriseren van vijf tumorlijnen die succesvol kunnen worden ingevroren en worden ontdooid het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een effectievere behandeling van plaveiselcelcarcinomen in het hoofdhals gebied. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Hoofdhals oncologie is een speerpunt voor de aanvragende instelling, waarvoor veel patiënten behandeld worden. Radiotherapie is een orgaansparende behandeling en wordt veel toegepast bij deze patiënten. De tumoren zijn echter intermediair gevoelig voor bestraling waardoor er ruimte is voor verbetering van de resultaten. De tumorlijnen die in deze projectaanvraag worden aangehouden in proefdieren, zijn onmisbaar voor onderzoek naar verbetering van de effectiviteit van bestraling. Het is aannemelijk dat er onderzoek met deze tumorlijnen zal blijven plaatsvinden. De commissie acht het in stand houden van deze lijnen daarom van substantieel belang. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het in stand houden van een uniek panel van humane tumoren t.b.v. onderzoek naar resistentiemechanismen. Het uiteindelijke doel is meer kennis te vergaren over resistentiemechanismen die zich voordoen bij carcinomen van squameuze cellen (SCC) zodat er een effectievere therapie ontwikkeld kan worden. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. *De voorgestelde wijziging richt zich op de karakterisering van tumorlijnen die succesvol kunnen worden ingevroren en kunnen worden ontdooid. Bij positief resultaat zal een tumorlijn uit het huidige panel worden vervangen door deze nieuwe tumorlijn, waardoor er minder dieren nodig zijn voor het in stand houden van het panel. De commissie vindt dit een positieve ontwikkeling. Er zijn nu weliswaar 80 extra dieren nodig voor dit onderzoek, maar op termijn zijn er waarschijnlijk minder dieren nodig voor het in stand houden van het panel humane tumoren waarmee onderzoek naar resistentiemechanismen wordt gedaan.*

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *De voorgestelde wijziging heeft geen gevolgen voor de ethische afweging.*

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 of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. Prof. dr. H. van Krieken
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020173905-1

Bijlagen
1

Datum 29 maart 2019
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte prof. dr. Van Krieken,

Op 10 januari 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Maintenance of human head and neck squamous cell carcinoma lines" met aanvraagnummer AVD1030020173905, waarvoor op 9 januari 2018 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD1030020173905-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u dieren toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Maintenance of human head and neck squamous cell carcinoma lines" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (hierna: de DEC) RUDEC. Dit advies is ontvangen op 4 maart 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

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 93118, 2509 AC 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 gegevens in het colofon.

Datum

29 maart 2019

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020173905-1

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).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen

- Vergunning

Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies



Datum
29 maart 2019
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020173905-1

Gewijzigde Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Uw vergunning wijzigt als volgt:

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren oorspronkelijk	Aantal dieren gewijzigd	Ernst
3.4.4.1 Instandhouden				
	Muizen	960	1040	Matig

Voor het overige blijft uw vergunning ongewijzigd.



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 1030020186045
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. _____
- 1.3 Provide the title of the project. Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
 - If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?
-

3.3 Relevance

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

3.4 Research strategy

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

The following four related, though conceptually independent, research questions will be addressed to meet our objective:

Determining the dose-dependent effects of the stress hormones NA and CORT on accuracy and strength of memory over time (DAP1).

1. Examining the dose-dependent effects of these two stress hormones on the neuronal representation in the systems consolidation framework (DAP1).
2. Unravelling the role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of these two stress hormones on memory accuracy vs generalisation (DAP2).
3. Providing causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the effects of these two stress hormones on memory accuracy vs generalisation (DAP3).

In brief, we will assess memory strength and accuracy (as well as its neural correlates) at different time intervals after modulating memory consolidation by stress hormone administration; i.e., the systemic administration of yohimbine (increasing NA levels in the brain), CORT or their respective vehicles. To be able to distinguish the effects of these stress hormones on memory strength and accuracy, three distinct behavioural tasks will be used. These three tasks differ in their level of emotional arousal (emotionally arousing vs emotionally neutral) as well as in the information that will be acquired (contextual memory vs item memory).

The rationale behind using three types of behavioural tasks is twofold. First, these experiments will allow determining whether stress hormones induce similar or differential effects on memory accuracy of an emotionally arousing vs. emotionally neutral learning experience. Second, these three behavioural tasks involve different types of memory that are subserved by independent neural systems; in the emotionally arousing task (inhibitory avoidance discrimination), the animal experiences episodic events which details are related to the specific association of an aversive experience (i.e., an electric shock) with its spatial context and the sequence in which they are exposed to differential contexts, for which memory is dependent on the hippocampus in the short term, but moves to the cortex in the long term (systems consolidation) [1]. In the neutral version of this task (object-in-context), the animal also experiences episodic events but the details are related to the specific association of an emotionally neutral item with its spatial context, for which memory is dependent on the hippocampus in the short term, but moves to the cortex in the long term (systems consolidation) [2]. Currently, it is not known if the same or different cortical regions are involved in the long-term storage of such emotionally arousing vs emotionally neutral information. In the third task (item recognition), cortical regions such as the perirhinal and insular cortex are mainly involved [3], and it is yet unclear if these memories undergo a time-dependent reorganisation and systems consolidation process as well. Thus, by using these two different behavioural tasks we will also determine whether stress hormones induce similar or differential effects on memory accuracy of information acquired with different emotionality and stored within different neural systems.

The emotionally arousing task used here is the inhibitory avoidance discrimination task [4]. In brief, in

this task mice will sequentially be exposed to two contextually distinct inhibitory avoidance apparatuses with a short interval, but they will receive footshock stimulation in the dark compartment of only one of these contexts. After different time intervals, the mice will be re-exposed to both of these contexts, as well as a novel context, and retention latencies to enter the dark compartment in each of them will be assessed. Long latencies to the shock-context are indicative of a strong memory, whereas long latencies also in the non-shock indicate memory generalisation, i.e., strong memory of the aversive experience per se but poor memory accuracy of the association of the aversive experience of footshock with the correct training context. Long latencies in the novel context can be considered as measure of generalised anxiety, as the mice have not been exposed to this box before and therefore cannot have a memory for it. Noteworthy, this task will likely induce a moderate amount of endogenous stress hormone release, this amount will be minimized by extensive handling of the animals prior to the experiment, as well as by using a low footshock intensity. As such, exogenous hormone administration is expected to work on top of the endogenous release.

The emotionally neutral version of this episodic task is the object-in-context task [2]. In brief, in this task mice will also be subsequently trained in two distinct contexts in which they can explore two sets of objects. They are placed in a first context in which they can explore two identical objects and immediately afterwards they are placed in a second context in which they can explore another set of two identical objects. After different time intervals, the mice will be re-exposed to one of these two training contexts (counterbalanced across animals) with one of each of the two different training objects. Accurate memory of the association of the object with its context is reflected by a preferred exploration of the object they had not seen previously in that particular context [2]. Generalised memory is reflected by a similar exploration of the two objects on the retention test (i.e., an inability to associate the object with its correct context), but a reduced exploration of both objects as compared to that of the training session (i.e., expressing a memory of having previously seen the two familiar (old) objects per se).

The object recognition task is the contextually independent version of this emotionally neutral task. In this task animals will be exposed to a box with three identical objects during training. At different times after training, the animals are placed again into this box, but two of the training objects will be replaced during the retention test; one by a completely novel and highly different object and the other by an object similar to the previously encountered one. Reduced preference of the mouse to explore the familiar (old) object is indicative of strong memory. An increased interest in the similar object (compared to familiar object) is indicative of memory accuracy, whereas a reduced exploration of the similar object (like that of the familiar/old object) is indicative of memory generalisation.

To be able to assess the neuronal representation activated during the consolidation of these training tasks, we will use a novel transgenic mouse model, the TRAP2 cFos-CreERT2xtdtomato mice. In these mice, the systemic administration of tamoxifen induces the permanent labelling of activated neurons over a certain time window [5,6]. Use of this mouse line enables us to label the original memory trace when the mice are exposed to the memory task and compare it to the retention-induced memory representation, and therefore allows us to investigate how stress hormone exposure modulates both the original memory trace and the systems consolidation process.

References

- [1] B. J. Wiltgen and K. Z. Tanaka, "Systems consolidation and the content of memory," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 106, pp. 365–371, Nov. 2013.
- [2] [2] A. Barsegyan, J. L. McGaugh and B. Roozendaal B "Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates the consolidation of object-in-context recognition memory." *Front. Behav. Neurosci.* 8:160 2014.
- [3] R. Adolphs, D. Tranel, and T. W. Buchanan, "Amygdala damage impairs emotional memory for gist but not details of complex stimuli," *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 4, pp. 512–518, Apr. 2005.
- [4] E. Atucha et al., "Noradrenergic activation of the basolateral amygdala maintains hippocampus-dependent accuracy of remote memory," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 34, pp. 9176–9181, Aug. 2017.
- [5] L. A. DeNardo et al., "Temporal Evolution of Cortical Ensembles Promoting Remote Memory

- Retrieval," BioRxiv. April. 2018.
- [6] W. E. Allen et al., "Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive," Science, vol. 357, no. 6356, pp. 1149–1155, Sep. 2017.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Animals will be tested in one of three behavioural tasks:

1) Inhibitory Avoidance Discrimination Task

For inhibitory avoidance discrimination training [1] [2], mice will first be placed into the start compartment of one inhibitory avoidance apparatus (Non-Shock box) and can explore this apparatus for 20-30 s without footshock exposure. After that, the mice will be removed from that apparatus and, after a short delay, placed into the start compartment of a second, contextually distinct, inhibitory avoidance apparatus (Shock box). After the animal enters the dark compartment with all four feet, the door will be closed and the animal will get a mild, single footshock (0.2-0.5 mA for 1-2 s), which generates a moderately strong fear memory for the apparatus itself, but does not cause any general anxiety-like phenotype [3]. At different times after training (between 1 and 28 days later, to test for memory generalisation over time), mice will be tested for retention latencies in the Shock box and Non-Shock box as well as in another inhibitory avoidance apparatus it has not seen on the training trial (Novel box). No shock will be administered on the retention test.

2) Object-in-Context Task

For object-in-context recognition training [4], mice are placed in a first context in which they can explore two identical objects (5-10 min) and immediately afterwards they are placed in a second context (for 5-10 min) in which they can explore another set of two identical objects. One of the training contexts is a wooden open-field box with black-and-white-striped walls and a floor covered with corncob bedding material. The other training context is a round plastic box with gray inner walls and a floor covered with standard sawdust (training in these two contexts will occur in counterbalanced order). At different times after training (between 1 and 14 days after training to test for memory generalization over time), mice will be tested (randomized across animals) in one of the two training contexts (5 min) with one of each of the two different training objects. One they had previously encountered in this test context and another object they had previously encountered in the other training context. Exploration of the two different objects will be measured.

3) Object Recognition Task

For object recognition training, mice will first be placed in the object discrimination apparatus and allowed to explore three identical objects for a period of between 3 and 10 min[5]. For retention testing (between 1 and 14 days after training), one of the previously encountered objects is replaced by a completely different novel object, whereas another one is replaced by a novel object but highly similar to the previously encountered one. Reduced preference of the mouse to explore the familiar object relative to the new ones is indicative for memory strength, whereas relative preference for the similar object (compared to the familiar one) indicates memory accuracy. Distinct testing intervals (targeting both short-term and long-term memory) are implemented to determine how the item memory becomes generalised over time and how this process is influenced by different levels of stress hormone administration.

This project will contribute to our understanding of how the stress hormones NA and CORT modulate memory accuracy and generalisation over time and thereby enhance our insight in the processes contributing to stress-related mental diseases. Based on preliminary findings as well as sparse literature, we expect that NA and CORT exert an opposite influence on these processes, with NA boosting memory accuracy by maintaining hippocampal/insular dependence of the memory, whereas CORT is expected to induce generalised memories by promoting the shift towards cortical (i.e., mPFC and ACC) structures.

For research aim #1 (DAP1) the approach will be:

In this first series of experiments we will investigate the effects of stress hormone administration on accuracy and strength of memory at different intervals after training in the three different memory tasks. We will test male mice, which following memory training will be administered yohimbine (0.3 or 1.0 mg/kg), CORT (1 or 3 mg/kg) or their respective vehicle controls systemically. Multiple drug dosages are a rule rather than an exception in pharmacological studies. More specifically, the dose-response effects of stress hormones on memory are non-linear [6], [7] and therefore multiple doses are absolutely necessary to describe how the stress hormones affect memory processes. Moreover, this approach will enable us to, for each task independently, determine the optimal dosage to use in DAPs 2 and 3, which intend to provide mechanistic insight and causality into the described effects. Furthermore, we will include an additional no-injection control group, as the injection of vehicle by itself may also cause moderate release of endogenous stress hormones.

In order to assess the influence of hormone administration on the attenuation of memory accuracy over time, different groups of animals will be tested for retention at different time intervals (targeting the transfer of memory from short-term to long-term memory) after training. The exact dynamics of the systems consolidation process is yet unknown and may be task-specific. Moreover, the passage of time goes hand in hand with an increased overall loss of memory (forgetting). Therefore, to best monitor the systems consolidation process, we will assess memory at three distinct time intervals, that are specific for each task. Again, this enables us to determine the optimal settings necessary for conducting the experiments described in DAPs 2 and 3.

These experiments will thus determine whether NA and CORT influence both the accuracy and strength of memory and how this modulation is affected over time. We expect that vehicle-treated (i.e., control) mice initially show accurate memory in the three different tasks (for the inhibitory avoidance discrimination task: long latencies to enter the dark compartment in the Shock box and short latencies to enter in the Non-Shock box; for the object-in-context task: preferred exploration of the object they had not seen previously in the tested context; for the object recognition task: long exploration time of the similar object, but short exploration of the familiar one) but that they will show increased generalisation over time. Importantly, we expect that yohimbine after the training will enhance both the strength and accuracy of the memory over time, whereas CORT will enhance memory strength, but reduce accuracy, and will cause generalised memories already at an earlier retention test.

For research aim #2 (DAP1) the approach will be:

We will determine the effect of stress hormone administration on the neuronal representation of the memory. For this, we will use the TRAP2 cFosCreERT2xtdtomato mice, in which the systemic administration of tamoxifen induces the permanent labelling of activated neurons over a certain time window. This enables us to label the original memory trace when the mice are exposed to the training tasks. Similar to aim 1, yohimbine (0.3 or 1.0 mg/kg), CORT (1 or 3 mg/kg), or their respective vehicles will be administered systemically after the training. Again, a no-injection control group will also be included. Retention tests will again be performed after certain time intervals (ranging from short- to long-term). However, here, we aim to standardize behaviour and therefore exposure to the previously encountered contexts, as variation herein heavily influences (biases) the neuronal activity observed. Therefore, for the inhibitory avoidance discrimination task, we will expose mice selectively to the dark compartment of each of the previously encountered contexts (Shock and Non-Shock box, in random order), with a short delay. Neuronal representations of memory accuracy vs generalisation and changes over time due to systems consolidation will be assessed by measuring immediate early gene (IEG) expression responses to re-exposure to these boxes and comparing their neuronal representations to each other and the original memory trace. Memory accuracy will be reflected as distinct neuronal activity induced by re-exposure to the Shock and Non-Shock boxes. Similarly, for the object-in-context task, mice will be placed in a retention context with two objects which they had either previously encountered in that context or with a set of objects that had been encountered in the other context. Following re-exposure to the first set of objects, mice will be exposed to the other set of objects in the same context (counterbalanced across animals). Similar as for the inhibitory avoidance discrimination task, IEG expression response to re-exposure to the different context exposures will be assessed and compared with the original memory trace. Memory accuracy of the object-context association will be reflected as distinct neural activity induced by re-exposure to the two contexts. Similarly, for the objection

recognition task, mice will be placed back in the training context, which either contains three copies of the familiar object, or three copies of the similar one (in random order). Similar as for the inhibitory avoidance discrimination task, IEG expression response to re-exposure to the different objects will be assessed and compared with the original memory trace. Memory accuracy will be reflected by distinct neuronal activity during the re-exposure to the similar object as compared to the familiar one, and comparison of re-exposure induced IEG expression to the original memory trace will be informative on the memory consolidation process.

Brain activity patterns will be analysed in the intact brain using iDISCO+[8] in combination with light-sheet microscope imaging. We expect that the improved memory accuracy induced by yohimbine is accompanied by increased neuronal activation of the hippocampus for the inhibitory avoidance discrimination task and object-in-context task, and perirhinal and insular cortex for the object recognition task during the post-training consolidation phase, as well as retention test (re-exposure). In contrast, we expect that CORT administration will increase memory generalisation at both time intervals by reducing activity in these regions during the consolidation phase and retention test. Both hormones are expected to contribute to memory strength by activating the mPFC/ACC.

For research aim #3 (DAP2) the approach will be:

We next aim to unravel the role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of these two stress hormones on memory accuracy vs generalisation. In aim 3, we aim to down/upregulate regional microRNA-134 levels (in the hippocampus for the inhibitory avoidance discrimination task and object-in-context task, and the insular cortex for the object recognition task) by local viral injections, and determine whether this will prevent or mimic the effect of post-training systemic yohimbine/CORT administration on memory accuracy at both the behavioural and neuronal level, implementing similar approaches as described for aims #1 and #2 (DAP1).

For research aim #4 (DAP3) the approach will be:

We aim to provide causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the effects of NA and CORT on memory accuracy and strength and their modulation by systems consolidation by directly manipulating amygdala-hippocampus/insular cortex and amygdala- mPFC pathways. We combine pharmacological hormone manipulations with DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drugs) technology[9] to selectively silence or activate the amygdala-hippocampus/insular cortex and amygdala-mPFC pathways immediately after training. This study will thereby determine whether the yohimbine effect on memory accuracy is causally linked to increased connectivity between the amygdala and hippocampus (for the inhibitory avoidance discrimination task and object-in-context task) or insular cortex (for the object recognition task), whereas the generalisation effect induced by CORT critically depends on the suppression of the exact same pathway. Moreover, we will test the hypothesis that both NA and glucocorticoids increase amygdala-medial prefrontal cortex (mPFC) circuits to enhance strength and long-term maintenance of the memory.

References

- [1] E. Atucha and B. Roozendaal, "The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 9, Mar. 2015.
- [2] E. Atucha *et al.*, "Noradrenergic activation of the basolateral amygdala maintains hippocampus-dependent accuracy of remote memory," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 34, pp. 9176–9181, Aug. 2017.
- [3] P. Atsak, D. Hauer, P. Campolongo, G. Schelling, R. V. Fornari, and B. Roozendaal, "Endocannabinoid Signaling within the Basolateral Amygdala Integrates Multiple Stress Hormone Effects on Memory Consolidation," *Neuropsychopharmacology*, vol. 40, no. 6, pp. 1485–1494, May 2015.
- [4] A. Barsegyan, J. L. McGaugh and B. Roozendaal B "Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates the consolidation of object-in-context recognition memory." *Front. Behav. Neurosci.* 8:160 2014.
- [5] A. Vogel-Ciernia and M. A. Wood, "Examining Object Location and Object Recognition Memory in

Mice: Examining Memory for Object Location and Object Recognition in Mice," in *Current Protocols in Neuroscience*, C. R. Gerfen, A. Holmes, D. Sibley, P. Skolnick, and S. Wray, Eds. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014, p. 8.31.1-8.31.17.

- [6] P. R. Zoladz and D. M. Diamond, "Linear and Non-Linear Dose-Response Functions Reveal a Hormetic Relationship between Stress and Learning," *Dose-Response*, vol. 7, no. 2, p. dose-response.0, Apr. 2009.
- [7] D. M. Diamond, "Cognitive, Endocrine and Mechanistic Perspectives on Non-Linear Relationships between Arousal and Brain Function," *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, vol. 3, no. 1, p. nonlin.003.01.0, Jan. 2005.
- [8] N. Renier, Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel, and M. Tessier-Lavigne, "iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging," *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 896-910, Nov. 2014.
- [9] D. G. R. Tervo *et al.*, "A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons," *Neuron*, vol. 92, no. 2, pp. 372-382, Oct. 2016.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

As described in 3.4.1. (Research Strategy), the approach of this project is to perform the experiments necessary to answer our four (related, but independent) research questions in a sequential manner.

- Firstly, behavioural effects on memory accuracy and its retention after different dosages of stress hormone administration will be assessed for three different behavioural tasks. These behavioural tasks differ in their level of emotional arousal (emotionally arousing vs emotionally neutral) as well as in memory types (episodic memory vs non-episodic item memory) involving differential neural circuits (DAP1).
- In parallel, the dose-dependent effects of stress hormones on the neuronal representations of these memory traces during memory consolidation and retrieval will be assessed (DAP1). Only after the completion of the experiments described in DAP1 we will continue with a more focussed assessment of the neural mechanisms, by restricting our studies only to the optimal drug dosages, time intervals of testing and behavioural circuits modulated in each task. Using this information, we will continue with DAP2 and DAP3, which form two complementary approaches of dissecting the neural mechanisms underlying the observed stress hormone effects.
- The role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of stress hormones on memory accuracy vs generalisation will be tested causally.
- In parallel, we will provide causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the behavioural and neural effects of these two stress hormones on memory accuracy vs generalisation.

Thereby, this project will produce output parameters covering a wide spectrum from the macroscopic system level to the microscopic molecular level; ranging from behavioural parameters (memory strength and accuracy for different memory types (episodic memory vs non-episodic item memory) that is further associated with different levels of emotional arousal (aim #1)), to activated neuronal networks (aim #2), to underlying mechanisms (aims #3 and #4). These data will be combined and compared across experiments, to - in the end - sketch a coherent picture of the effects of stress hormones on memory processes.

Thus, all DAPs will generate interesting results by themselves and there is no necessity to introduce go/no-go moments.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	
2	

3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1030020186045-2 (2018-0014)
 2. Titel van het project: Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time
 3. Titel van de NTS: De effecten van stresshormonen op de accuraatheid van het geheugen: een studie naar de hersenmechanismen en de effecten van tijd.
-
1. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186045
 2. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
 3. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 07-02-2019
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-02-2019
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 25-02-2019
 4. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
 5. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 6. Correspondentie met de aanvrager: n.v.t.
 7. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186045. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, gemarkeerd met *italics*, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag richt zich op het meten van de effecten van de toediening van noradrenaline en corticosteron op die mechanismen in het brein die ten grondslag liggen aan de accuraatheid/juistheid van het geheugen en het verloop daarvan op de lange termijn na zowel emotioneel ontwrichtende als emotioneel neutrale informatie. Ten gevolge van stress worden twee signaaltransductieroutes in ons brein geactiveerd. Aan de ene kant activeert stress snel het orthosympathische zenuwstelsel, wat resulteert in het vrijkomen van catecholamines zoals adrenaline en noradrenaline (NA). De catecholamines komen niet rechtstreeks in het brein, maar verhogen de NA niveaus in de hersenen door activatie van noradrenerge celgroepen binnen de nucleus tractus solitarius (NTS) en de locus coeruleus (LC). De toename van de noradrenerge signalering wordt in deze projectaanvraag bewerkstelligd door de toediening van yohimbine. Aan de andere kant kent stress ook een vertraagde respons die resulteert in de ophoping van corticosteroiden en activatie van de hypothalamus-schildklier-bijnier-corticoïde tot gevolg heeft. De corticosteroiden (CORT, corticosteron in knaagdieren, cortisol in mensen) kunnen wel direct opgenomen worden in het brein en binden aan receptoren die het signaal doorgeven. Daarnaast kunnen ze de activiteit van een groot aantal genen beïnvloeden die betrokken zijn bij een veelvoud aan cellulaire processen zoals energie verbruik, cellulair metabolisme, eiwitsynthese en turnover, signaal transductie, neuronale connectiviteit, en neurotransmissie zowel induceren als onderdrukken. Door middel van deze mechanismen zijn corticosteroiden in staat de neuronale processing op een tijdsafhankelijke wijze te beïnvloeden om zodoende de meest adaptieve vorm van stress respons te produceren. Een indrukwekkende hoeveelheid literatuur geeft aan dat zowel NA als CORT de effecten van stress en emotionele agitatie op de verbetering van geheugenconsolidatieprocessen mediëren door aan te grijpen op een netwerk van interagerende hersengebieden, waaronder de basolaterale amygdala, de dorsale hippocampus, en de insulaire en prefrontale cortex. De aanvrager wil met de experimenten beschreven in deze projectaanvraag onderzoeken hoe de stresshormonen NA en CORT de geheugenprocessen die ten grondslag liggen aan de accuraatheid/juistheid van het geheugen versus de veralgemenisering van het geheugen, moduleren. Daartoe stellen ze zich 4 subdoelen:
 1. Bepaling van de dosis-afhankelijke effecten van de twee stresshormonen NA en CORT op de accuraatheid en de sterkte van herinneringen over de tijd
 2. Het onderzoeken van de dosis-afhankelijke effecten van de twee stresshormonen NA en CORT op de neuronale representatie binnen het netwerk van de interagerende hersengebieden
 3. Onderzoeken van de mediërende rol van een neurotrofe factor (BDNF) in de effecten van deze twee stresshormonen op de accuraatheid van de herinneringen versus de veralgemenisering
 4. Het oorzakelijke verband vinden voor de modulatie van het geheugencircuit in het brein in het bewerkstelligen van de effecten van deze twee stresshormonen op de accuraatheid van de herinneringen versus de veralgemenisering

Om herinneringen en de hersenmechanismen die eraan ten grondslag liggen op een gecontroleerde manier te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van muismodellen die twee geheugentaken zullen ondergaan, één neutrale taak en één emotionele taak, beide afhankelijk van een ander geheugencircuit in het brein, waarin de sterkte en accuraatheid van de herinneringen onafhankelijk van elkaar bepaald kunnen worden. *De onderzoekers willen middels dit wijzigingsverzoek een derde geheugentaak gebruiken, die emotioneel gezien neutraal is en context afhankelijk (episodische geheugentaak). De hierboven beschreven geheugentaken verschillen namelijk niet alleen wat betreft emotionele lading, maar ook wat betreft geheugentype (episodisch of niet-episodisch). De derde taak wordt toegevoegd om te kunnen onderscheiden of verschillen in activiteitspatronen of specifieke pathways in de hersenen worden veroorzaakt door het verschil in geheugentype of door verschil in emotionele lading die is verbonden aan de taak. De commissie beschouwt dit als een wetenschappelijke*

verfijning van de aanvraag.

De commissie constateert dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de moleculaire mechanismen geven. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om meer inzicht te krijgen in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en in de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein. Het uiteindelijke doel is om wanneer men weet hoe de stresshormonen de accuraatheid van het geheugen beïnvloeden op zowel de korte als lange termijn, de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS) bij patiënten te begrijpen en, op termijn, een therapie te ontwikkelen voor deze patiënten. In patiënten die lijden aan post traumatische stress stoornis (PTSS) is te zien dat de herinnering aan hun trauma vaak feitelijk onjuist is, en dat deze herinnering te pas en te onpas opgehaald wordt, dus ook onder omstandigheden die vaak maar zeer beperkt op de traumatische gebeurtenis lijken. Er wordt verondersteld dat deze generalisatie van stressvolle traumatische herinneringen naar andere omstandigheden bijdraagt aan de ontwikkeling van PTSS. Daarom is het erg belangrijk te begrijpen hoe stresshormonen de accuraatheid (d.w.z. de feitelijke juistheid) van herinneringen beïnvloeden. Het is hierbij belangrijk te weten dat herinneringen normaal ook minder accuraat en gedetailleerd worden met het verstrijken van de tijd. De herinnering aan emotionele of traumatische gebeurtenissen, vooral in patiënten met PTSS, lijkt echter gevoelsmatig maar weinig te vervagen met het verstrijken van de tijd. Het is tot op heden niet bekend of dit ook echt zo is en hoe dit komt. *Voorts is niet bekend of dezelfde of verschillende corticale gebieden zijn betrokken bij de langetermijn opslag van emotionele gebeurtenissen en van neutrale gebeurtenissen. Door een episodische geheugentaak toe te voegen die plaatsvindt onder emotioneel neutrale omstandigheden (in aanvulling op de episodische geheugentaak onder emotionele omstandigheden) kan dit worden onderzocht.*

Er is daarom binnen deze aanvraag een reële relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de werkingsmechanismen, signaal transductie pathways en betrokken neurologische circuits in het brein als effecten van de toegenomen stresshormonen NA en CORT nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen, en dat er behoefte is aan

nieuwe behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor PTSS. PTSS is een moeilijk te behandelen aandoening die de patiënt sterk belemmert in diens sociaal en emotioneel functioneren. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor patiënten die lijden aan PTSS is van groot belang voor de samenleving. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met de voorgestelde technieken (gedragsstudies, virale injecties in het brein, immunohistochemie in combinatie met de gebruikte transgene reporterlijn, en de beschreven iDISCO+ techniek om patronen van neurale activiteit in het gehele brein te kunnen volgen). Alle benodigde faciliteiten en expertise zijn aanwezig. Het voorgaande onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
8. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch aan bij de doelstelling(en) (zie C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - x Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
- De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: het toedienen van een voetschok aan de muizen, noodzakelijk in de 'inhibitory avoidance discrimination' taak, levert naar verwachting matig ongerief op voor de dieren omdat zij gedurende een heel korte periode pijn hiervan zullen ondervinden. Het ondervinden van die pijn is echter kritisch en essentieel voor de test. De DEC is het eens met deze onderbouwing. Bij de operationele procedure van het implanteren van een canule in de hersenen wordt wel adequate anesthesie en analgesie toegepast. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De commissie gaat ervan uit dat de toegevoegde gedragstest maximaal licht ongerief zal veroorzaken.*
10. In de aanvraag wordt, om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De dieren zullen allemaal gedurende langere tijd (1-2 mnd) individueel gehuisvest worden. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden: individuele huisvesting is noodzakelijk na het implanteren van de breincanules. De canules worden afgedicht met een metalen pin, die de dieren bij groepshuisvesting bij elkaar zullen verwijderen, waardoor de kans op infectie en mutilatie toeneemt. Omdat individuele huisvesting ook een effect heeft op de gedragsstudies, individuele huisvesting in bijlage 2 noodzakelijk is en de experimenten met elkaar vergelijkbaar moeten zijn, is individuele huisvesting van alle dieren noodzakelijk. En last but not least zal individuele huisvesting de effecten van sociale hiërarchie en de effecten van de volgorde waarin de dieren aan het experiment onderworpen worden, wegnemen. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor alle dieren is ingeschat als matig. Voor de dieren in bijlage 1 wordt dit veroorzaakt door de individuele huisvesting en de blootstelling aan de voetschok, en voor de dieren in bijlage 2 en 3 wordt dit veroorzaakt door de individuele huisvesting, het bijkomen uit narcose na de operatie en het ondergaan van de gedragstesten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. De integriteit van dieren wordt fysiek en mentaal aangetast door het toedienen van een voetschok en het toedienen van injecties en voor een deel van de dieren (bijlage 2+3) het ondergaan van een operatie. De integriteit van dieren wordt mentaal aangetast door het ondergaan van de individuele huisvesting en de gedragstesten. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat een humaan eindpunt zal bereiken is naar

verwachting zeer laag. Dit is op basis van eigen ervaring en gegevens uit de wetenschappelijke literatuur ingeschat. Voor de experimenten in bijlage 1 (1260 dieren) wordt niet verwacht dat er humane eindpunten bereikt zullen worden. Voor de experimenten in bijlage 2 (2680 dieren) wordt verwacht dat < 2% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken ten tijde van de herstelfase na de operatie. In bijlage 3 (1717 dieren) wordt eveneens verwacht dat < 2% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken ten tijde van de herstelfase na de operatie. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De muis is het evolutionair gezien een geschikte diersoort waarin gedragsstudies kunnen worden uitgevoerd die conclusies rechtvaardigen over vergelijkbare situaties bij mensen. In tegenstelling tot bij mensen, kunnen de omgevingsfactoren, zoals het exacte moment en de exacte intensiteit en duur van de blootstelling van de stimulus, bij de muis volledig gecontroleerd worden. Het bestuderen van de neuronale circuits die betrokken zijn in de gedragsstudies kunnen alleen *in vivo* uitgevoerd worden en kennen geen *in vitro* of *in silico* alternatieven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoekopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen en de onderzoekers hebben goed gemotiveerd welke experimentele en controle groepen absoluut noodzakelijk zijn voor de experimenten. *De toegevoegde gedragstest dient uitgevoerd te worden met aparte groepen dieren, omdat de retentie-intervallen en de te gebruiken medicatie verschillen tussen de testen. Het totaal aantal benodigde dieren neemt derhalve toe door de voorgestelde wijziging.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De onderzoekers nemen alle mogelijke maatregelen om het ongerief van de dieren te beperken, echter het toedienen van een éénmalige, relatief milde voetschok, is kritisch voor het experiment omdat die gebeurtenis het onderzoek naar het geheugen voor stressvolle perioden en gebeurtenissen mogelijk maakt. Eveneens essentieel voor de vergelijking van deze experimenten onderling en met eerdere resultaten, is de individuele huisvesting van de dieren die ongetwijfeld van invloed is op het gedrag. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: - de afgifte en effecten van stresshormonen zijn afhankelijk van sexe en ontwikkelingsstadium, - alle voorgaande data waarmee deze resultaten vergeleken zullen worden, zijn verkregen in mannetjes, en - het toedienen van tamoxifen, een oestrogeen receptor ligand noodzakelijk voor de expressie van de tomatokleur in de transgene lijn ter identificatie en lokalisatie van de neuronen, kan invloed hebben op het gedrag in vrouwtjes. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven

met alleen mannelijke dieren uit te voeren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen). *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De wijziging is verwerkt in de NTS.*

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het verkrijgen van meer inzicht in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein, en in de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS) bij patiënten om, op termijn, een therapie te ontwikkelen voor deze patiënten, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
2. Er vindt een matige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
Voor patiënten is dit onderzoek op termijn en indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Emotionele of stressvolle gebeurtenissen kunnen sterke, blijvende herinneringen veroorzaken. Dit is vooral een adaptief verschijnsel, dat ervoor zorgt dat belangrijke gebeurtenissen goed onthouden worden. Echter, het kan er ook toe leiden dat traumatische gebeurtenissen in het geheugen gegrift lijken te staan, en telkens weer (ongewild) herinnerd worden. Hoewel de herinneringen vaak erg levendig en invasief zijn, met een gevoel voor groot detail, kunnen ze opgehaald worden door willekeurige factoren en onder verschillende omstandigheden, die vaak niet gerelateerd zijn aan het trauma, zoals in PTSS. Momenteel gaan er 7,7 miljoen mensen in Europa alleen al gebukt onder PTSS en lijden daarnaast nog vele miljoenen mensen aan een fobie of een andere angststoornis. Dit belemmert hen sterk in hun sociaal en emotioneel functioneren. De behandelingsmogelijkheden schieten op het moment nog sterk tekort; minder dan de helft van de PTSS patiënten heeft baat bij huidige behandeling. Daarom is het van groot belang beter te begrijpen hoe stresshormonen niet alleen de sterkte van herinneringen beïnvloeden, maar ook hun accuraatheid (juistheid). Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het begrip van de werkingsmechanismen van de stresshormonen NA en CORT en de bijdrage die dit op termijn kan leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor o.a. PTSS patiënten van groot wetenschappelijk en maatschappelijk belang. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verkrijgen van meer inzicht in de invloed van de stresshormonen noradrenaline en corticosteron op de kwaliteit van het geheugen en de daarbij betrokken geheugencircuits in het brein, en in de processen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van een Post Traumatische Stress Stoornis (PTSS). De DEC is van mening dat het wetenschappelijk belang van het onderzoek en de belangen van PTSS-patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie van handelingen, het niet toepassen van pijnbestrijding tijdens en na het opzettelijk toedienen van een voetschok, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden, omdat het opbouwen van een herinnering aan een stressvolle en pijnlijke ervaring essentieel is voor deze experimenten. De DEC is van mening dat de afwijkende behandeling daarmee acceptabel is.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *Door de voorgestelde wijziging zijn 2097 extra dieren nodig voor het onderzoek. Er zijn weliswaar veel extra dieren nodig, maar het ongerief voor deze dieren is vergelijkbaar met het ongerief voor de reeds vergunde dieren, en de extra experimenten leveren een belangrijke bijdrage aan het op de juiste wijze kunnen interpreteren / duiden van de resultaten. Per saldo is de commissie daarom nog steeds van oordeel dat het belang van dit onderzoek opweegt tegen de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - x De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. Prof. Dr. J.H.J.M. van Krieken
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020186045-2

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
2

Datum 21 maart 2019
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte Prof. Dr. van Krieken,

Op 7 februari 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time" met aanvraagnummer AVD1030020186045, waarvoor op 11 oktober 2018 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD1030020186045-2. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u een derde geheugentaak, de object-in-context task, toe te voegen in alle drie de bijlagen dierproeven. Dit betreft een verhoging met in totaal 2796 dieren.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 25 februari 2019 en aangevuld op 19 maart 2019. De aanvulling betrof een verheldering van een verschrijving in het DEC advies. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum

21 maart 2019

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020186045-2

Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 11 oktober 2018 een vergunning is verleend.

Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Determining the effects of stress hormones on behavioural and neuronal readouts of accuracy and strength of memory over time	Muizen (Mus musculus)	1260 1890	100% matig
3.4.4.2 Unravelling the role of a neurotrophic factor (BDNF) in mediating the effects of stress hormones on memory	Muizen (Mus musculus)	2680 4010	100% matig
3.4.4.3 Providing causal evidence for the modulation of neural circuit function in the establishment of the effects of stress hormones on memory accuracy	Muizen (Mus musculus)	1717 2553	100% matig

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.

U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 93118, 2509 AC, 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 gegevens in het colofon.

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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen

- DEC-advies + aanvullend advies
- Weergave wet- en regelgeving

Datum
21 maart 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020186045-2



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 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.

Datum
21 maart 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020186045-2

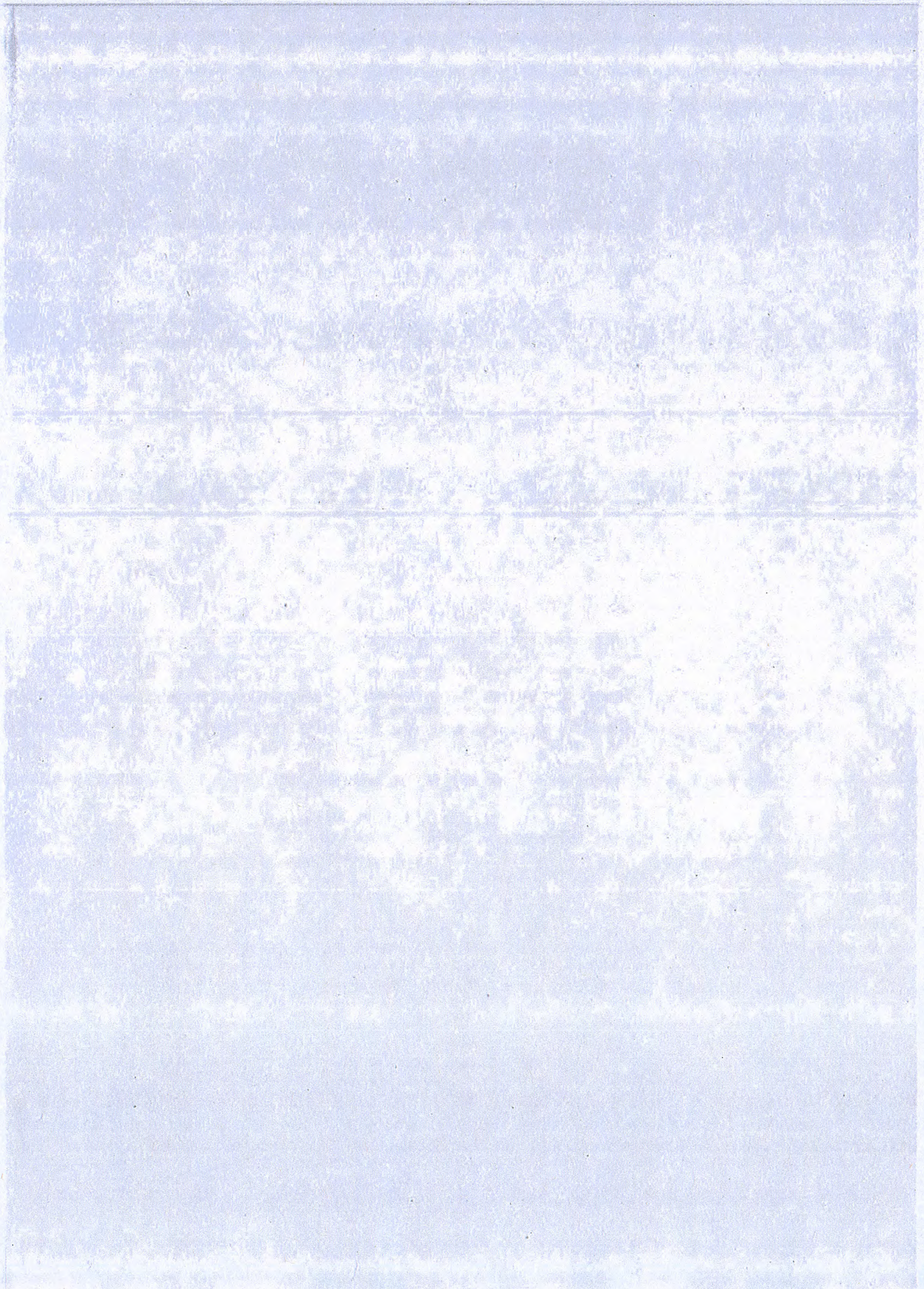
Einde van een dierproef

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.





Centrale Commissie Dierproeven

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 10300	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Heeft u al een AVD nummer?	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw AVD nummer in 1030020186045	
		<input type="checkbox"/> Nee	
1.3	Wat voor aanvraag doet u?	<input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag	Komt de aanvraag in aanmerking voor de vereenvoudigde procedure? <input type="checkbox"/> Ja > Ga verder met vraag 1.4 <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 1.4
		<input checked="" type="checkbox"/> Wijziging of melding > Ga verder met vraag 2.1	
1.4	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder Titel: Prof. dr. Voorletters: H. Achternaam: Van Krieken	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw 10.2 .e. en g
		E-mailadres gemachtigde	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer Geert Groteplein	29 / HP 231
		Postcode en plaats 6525 EZ Nijmegen	
		Postbus, postcode en plaats 9101 6500 HB Nijmegen	
1.5	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. 10.2 .e. en g

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	10.2.e.eng@radboudumc.nl	
	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e.eng	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	10.2.e.eng@radboudumc.nl	
	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
1.8 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	E-mailadres		
	Telefoonnummer	0243619075	
1.9 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	E-mailadres	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl	
		<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
		<input type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 2.2
	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze wijziging inhoudt en onderbouw deze. Antwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
	Bijlage: tekst voor wijziging.
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	11 - 10 - 2018
	Einddatum (t/m)	31 - 08 - 2023
3.2 Wat is de titel van het project?	Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Generalisatie van geheugen door stress: een neurobiologisch onderzoek naar de effecten van stresshormonen op geheugenaccuraatheid over de tijd	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie	Naam DEC	RU DEC
	Postadres	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (HP 231)

(DEC) van voorkeur?

E-mailadres

dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (optioneel) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: RadboudUMC / Mw. 10.2 e. eng	Afdeling: 10.2 e. eng
Straat: Geert Groteplein	Huisnummer: 29 / HP231
Postcode: 6525 EZ	Plaats: Nijmegen
Postbus: 9101	Postcode: 6500 HB
Plaats: Nijmegen	
E-mail: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl	

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: Kostenplaats: 040823-461220 CDL projectnummer: 2018-0014

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

Bijlage: tekst voor wijziging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.9). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	10.2 e. eng
Functie	IvD
Plaats	Nijmegen
Datum	03 - 09 - 2020
Handtekening	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1030020186045-5 (2018-0014)
2. Titel van het project: Memory generalisation by stress: a neurobiological investigation into the effects of stress hormones on memory accuracy over time
3. Titel van de NTS: De effecten van stresshormonen op de accuraatheid van het geheugen: een studie naar de hersenmechanismen en de effecten van tijd.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186045
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 03-09-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en): van 15-09-2020 tot 25-09-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 09-10-2020
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 15-09-2020
 - Datum antwoorden: 25-09-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Middels uw wijzigingsverzoek vraagt u toestemming voor drie zaken:

1. 1080 en 180 extra dieren om de vraagstelling adequaat te kunnen beantwoorden.
2. 2x450 muizen om de directionaliteit vast te stellen.
3. correctie van een eerder amendement: 1590 extra dieren.

-De commissie begrijpt de noodzaak voor onderdeel 1 om een extra (lagere) moeilijkheidsgraad van de taak toe te voegen, maar zet vraagtekens bij de haalbaarheid van het onderzoek in de huidige, meerdere malen gewijzigde, vorm (met grofweg driemaal zoveel dieren als in de oorspronkelijke aanvraag) binnen de looptijd van het project. Kunt u inzichtelijk maken welke onderdelen uit uw projectaanvraag al zijn uitgevoerd, welke

onderdelen nog daadwerkelijk uitgevoerd dienen te worden, en hoe de rest van het onderzoek kan worden gepland (bijvoorbeeld met een tijdslijn) in de resterende looptijd van het project?

Antwoord: Er werken 3 promovendi en 1 postdoc op dit project. We zijn met onze experimenten begonnen in november 2018, en hebben de experimenten zoals beschreven in DAP1 zo goed als afgerond. De resultaten zijn in lijn met onze verwachtingen, nl dat noradrenerge stimulatie de accuraatheid van het geheugen verbetert, terwijl corticosteron dat niet doet of juist de accuraatheid verslechtert. De noradrenerge effecten gaan gepaard met toegenomen excitatoire activiteit in de hippocampus en insulaire cortex (afhankelijk van de taak), terwijl corticosteron juist zorgt voor een toename in inhibitoire hippocampale activiteit. De eerste DREADD experimenten van manipulaties van amygdala-insulaire cortex connecties uit DAP3 zijn ook getest. Recentelijk is ook de postdoc aan de slag gegaan, m.n. met de fiberfotometrie experimenten. De eerste pilotstudies hiervoor zijn inmiddels succesvol afgerond. Een grove planning voor de komende periode is als volgt;

2020: - afronding al goedgekeurde experimenten DAP1 (PhD 1-3)

- afronding amygdala-insula experimenten DAP3 (PhD 1)

- start experimenten met nieuwe taak settings DAP1 om corticosterooneffecten aan te tonen (PhD 2, postdoc)

- start fiberfotometrie experimenten amygdala-hippocampus/PFC (postdoc)

2021: - afronding experimenten met nieuwe taak settings DAP1 (PhD 2-3)

- uitvoering amygdala-PFC DREADD experimenten DAP3 (PhD 1)

- uitvoering amygdala-hippocampus/PFC DREADD experimenten DAP3 (PhD 2)

- uitvoering microRNA experimenten DAP2 (PhD 3)

- afronding fiberfotometrie experimenten amygdala-hippocampus/PFC (postdoc)

- uitvoering fiberfotometrie experimenten amygdala-hippocampus/PFC + DREADD (postdoc)

2022: - uitvoering microRNA experimenten DAP2 (PhD 3)

- uitvoering fiberfotometrie experimenten amygdala-insular cortex/PFC (postdoc)

2023: - uitvoering fiberfotometrie experimenten amygdala-insular cortex/PFC + DREADD (postdoc)

Het is hierbij belangrijk op te merken dat gebaseerd op voortschrijdend inzicht waarschijnlijk niet alle experimenten zoals beschreven in de DAPs uitgevoerd hoeven te worden. Momenteel omvat onze projectaanvraag een volledige matrix waar we voor ieder van de drie de gedragstaken de effecten van twee stresshormonen willen testen op twee of drie verschillende tijdsintervallen. In plaats van deze matrix stug volledig uit te voeren, evalueren we telkens welke bevindingen uit DAP1 verdere toetsing in DAPs 2 en 3 behoeven. Daarmee is de beslissing tot uitvoering van deze experimenten continue onderhevig aan voortschrijdend inzicht. Uit de experimenten met bijvoorbeeld de object recognition taak blijkt dat dieren deze ook na stresshormoontoediening na twee weken zijn vergeten, en daarom is het weinig relevant om ook in DAP2 en 3 naar de effecten op de lange termijn te kijken. Verder zullen de microRNA experimenten zoals beschreven in DAP2 zich voornamelijk richten op de hippocampale geheugentaken; mogelijk dat de rol van microRNA 134 in niet-hippocampaal geheugen beperkt blijkt

- Is het voor onderdeel 2 mogelijk te volstaan met het uitvoeren van uitsluitend die controles voor mogelijke reciproke connectieve activiteit wanneer een effect wordt waargenomen in de andere richting (dus in feite een go/no go moment inbouwen)? De commissie ging er vanuit dat de directionaliteit van de projecties al was ingecalculeerd in uw experimenten.

Antwoord: Helaas is dit niet mogelijk om twee redenen. Ten eerste is de directionaliteit van de effecten die we willen manipuleren middels DREADD niet bekend, en wordt voornamelijk gebaseerd op onze hypothese voor een modulerende rol van de amygdala en eerdere