

	<b>Dossier: AVD10800202216665</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>2X</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Spelen voor weerbaarheid en cognitieve controle
NTS-identificatiecode	NTS-NL-573410 v.1, 22-03-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	spelen stress weerbaarheid cognitie neurobiologie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Psychische aandoeningen komen veel voor, naar schatting kampt 15-20% van de bevolking over de hele wereld met psychische problemen. Psychische aandoeningen ontstaan vaak in de kindertijd of bij jongeren en bij de meeste psychische aandoeningen is er sprake van verminderde cognitieve controle. Met cognitieve controle bedoelen we de mogelijkheid van een individu om gedrag te onderdrukken maar ook cognitieve flexibiliteit (het vermogen je aan te passen). Cognitieve controle is belangrijk om goed te kunnen functioneren onder dagelijkse omstandigheden en om je te kunnen aanpassen aan veranderende en stressvolle omstandigheden.</p> <p>We denken dat ervaring met spelen op jonge leeftijd kan bijdragen aan cognitieve controle en meer weerbaarheid tegen psychische aandoeningen. Uit eerder onderzoek weten we dat sociaal spel bij ratten bijdraagt aan cognitieve processen, en dan met name onder uitdagende omstandigheden, en de ontwikkeling van het voorste deel van de hersenschors, de prefrontale cortex, dat belangrijk is voor het nemen van beslissingen. Maar we weten nog weinig over andere vormen van spel, zoals spel waarbij risico's genomen kunnen worden (zoals spelen op hoogte, met grote snelheid, met gevaarlijke materialen). Dit is belangrijk omdat de mogelijkheden om risicovol te spelen steeds verder onder druk komt te staan in de huidige maatschappij, waar minder ruimte is én volwassenen steeds meer risicovermijdend zijn geworden. Door te spelen – juist in risicovolle omstandigheden – denken we dat kinderen maar ook jonge dieren kunnen oefenen met hun fysieke vaardigheden, maar ook met het oplossen van problemen. Het is daarom interessant en belangrijk om te begrijpen hoe spel (sociaal spel maar ook risicovol spel) bijdraagt aan de ontwikkeling van cognitieve controle en de weerbaarheid tegen stress.</p> <p>Het doel van dit project is om de rol van spelgedrag in de ontwikkeling van cognitieve controle en stressbestendigheid te bestuderen, en de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij deze processen te onderzoeken. Hierbij ligt de focus op de volgende drie aspecten:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. De impact van (risico's in) spel op de ontwikkeling van cognitieve controle</li><li>2. De invloed van (risico's in) spel op cognitieve controle onder (herhaalde) stress later in het leven</li><li>3. Het bepalen van de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij cognitieve controle in relatie tot spelervaring en herhaalde stress</li></ol>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid</p>	<p>De kennis die voortkomt uit dit project zal helpen om beter te begrijpen hoe het spel (sociaal spel maar ook risicovol spel) de ontwikkeling van cognitieve controle, de stressbestendigheid later in het leven én de ontwikkeling van de hersenen beïnvloedt. Deze kennis is van groot belang voor het ontwikkelen van preventiestrategieën om de stressbestendigheid van kinderen te vergroten en de risico's op mentale gezondheidsproblemen te verlagen. Dit is juist nu van belang nu de mentale gezondheid van jongeren onder druk staat.</p>

tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Om cognitieve controle te kunnen meten worden de ratten in deze studie getest in taken waarbij ze in een conflictsituatie zijn gebracht. In deze taken kunnen de dieren werken voor of zoeken naar een beloning, terwijl ze geconfronteerd worden met een waarschuwingssignaal dat een milde elektrische voetschok voorspelt.</li> <li>• Om de stressbestendigheid van ratten die al dan niet sociaal of risicovol gespeeld hebben te bepalen, zullen we de dieren herhaaldelijk blootstellen aan stress en bloed afnemen om stresshormonen te kunnen meten.</li> <li>• Om de neurobiologische processen, die betrokken zijn bij cognitieve controle in dieren die al dan niet sociaal of risicovol gespeeld hebben, te kunnen meten moeten we de ratten onder verdoving brengen en opereren.</li> </ul>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De dieren in dit project kunnen last hebben van de voetschokken, de blootstelling aan stress en de bloedafnames. Daarnaast zal een deel van de dieren ook geopereerd moeten worden, wat nadelige effecten van de verdoving met zich mee kan brengen. Ook moet een deel van de dieren (tijdelijk) alleen worden gezet om de invloed van sociaal spel te kunnen meten. Deze factoren kunnen een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>1816</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1816</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	1816	0	0	1816	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	1816	0	0	1816	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>520</td> <td>0</td> <td>344</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	520	0	344					
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	520	0	344														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De ratten uit dit onderzoek zullen waar mogelijk (864 van de 1816) worden aangeboden voor hergebruik door andere onderzoekers of voor onderwijsdoeleinden. Als dat niet mogelijk is, zullen we deze dieren aanmelden voor adoptie. Een deel van de ratten (952 van de 1816) zal worden gedood omdat het voor een deel van de experimenten noodzakelijk is om te kunnen controleren of we in de juiste hersengebieden hebben gemeten of ingegrepen.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Omdat de focus voor dit project ligt op gedrag, te weten de complexe wisselwerking tussen spelgedrag, cognitieve controle en stressbestendigheid, en de ontwikkeling van complexe hersencircuits in relatie tot spelgedrag, is het niet mogelijk om deze studie uit te voeren met cellen of nabootsing in de computer. Ook studies met mensen zijn niet geschikt om direct de invloed van verschillende gradaties van spel op de ontwikkeling van hersenen en gedrag te bestuderen op een zo gecontroleerde en neurobiologisch gedetailleerd niveau als we dat voor dit onderzoek moeten doen. De gedetailleerde analyses van diergedrag onder gecontroleerde omstandigheden zijn essentieel om beter te begrijpen hoe gradaties in blootstelling aan spelgedrag jongeren weerbaarder kan maken tegen psychische aandoeningen.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Het is niet mogelijk om voor deze studie overtollige proefdieren uit andere dierproeven te gebruiken, omdat de dieren dan al beïnvloed zouden zijn. Bovendien moeten de dieren voor dit onderzoek heel jong zijn (21 dagen) omdat de vraagstelling gaat over spel dat maximaal tot uiting komt tussen dag 21 en 42 na de geboorte. We zullen zoveel mogelijk dieren aanmelden voor hergebruik of adoptie. Bovendien zijn de gedragstaken zo opgezet dat de dieren in veel gevallen zowel in de controle conditie (bijvoorbeeld geen conflict) en de test conditie (wel een conflict) getest worden, en daarmee hun eigen controle kunnen zijn. Hierdoor is geen aparte controlegroep nodig, wat maakt dat er minder dieren nodig zijn voor dit onderzoek.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Vanwege de aard van de experimenten (dagelijkse training) zullen de dieren elke werkdag worden gehanteerd (opgepakt en bekeken) door onze onderzoekers. Onze dieren zijn niet alleen gewend aan het hanteren vóór het begin van de experimenten, maar ook aan het hanteren tijdens de experimenten, waardoor de dieren minder stress ervaren. Individuele huisvesting is tot een minimum beperkt (in de meeste gevallen maximaal 3 weken), en de dieren die sociaal geïsoleerd gehuisvest worden hebben nog wel de nabijheid van een leeftijdsgenoot die ze kunnen zien, horen en ruiken. Enkel de fysieke sociale spelinteractie is niet mogelijk door het geplaatste perspex wandje.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Lister Hooded ratten zijn onderzoekend en makkelijk te trainen, en daardoor zeer geschikt voor complexe gedragstaken. We hebben veel ervaring met deze stam voor zowel spel als cognitieve onderzoek. Voor dit onderzoek zijn jonge dieren nodig, omdat jonge dieren veel spelgedrag laten zien. We hebben veel ervaring met spelgedrag bij deze ratten, en weten dat er belangrijke overeenkomsten zijn tussen het spel van ratten en die van andere zoogdieren waaronder de mens. De basis van dit onderzoek is dat we gaan onderzoeken hoe spel (of afwezigheid van spel) op jonge leeftijd bijdraagt aan de ontwikkeling van hersenen en gedrag.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--------------------------------------------------------------	--



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

<input checked="" type="checkbox"/> Ja	> Vul uw deelnemernummer in	10800
<input type="checkbox"/> Nee	> U kunt geen aanvraag doen	

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag	> Ga verder met vraag 1.3
<input type="checkbox"/> Wijziging	> Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
<input type="checkbox"/> Melding	> Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
	██████	█	██████	

E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl			
----------------------------	---------------------	--	--	--

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
	n.v.t.			

E-mailadres gemachtigde				
-------------------------	--	--	--	--

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht		50
----------------------	--------------------------------------	--	----

Postcode en plaats	3584CJ	UTRECHT	
--------------------	--------	---------	--

Postbus, postcode en plaats	80125	3508TC	UTRECHT
-----------------------------	-------	--------	---------

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	████████████████████	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
-----------------------------	----------------------	-----------------------------------------------------------------------

Functie	████████████████████		
---------	----------------------	--	--

Afdeling	Dier in Wetenschap en Maatschappij, Population Health Sciences		
----------	----------------------------------------------------------------	--	--

Telefoonnummer	████████████████		
----------------	------------------	--	--

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Universitair Docent
		Afdeling	Translational Neuroscience, UMCU
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> 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	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
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: 1 - 2 - 2023 Einddatum (t/m): 31 - 1 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Risicovol spelen voor weerbaarheid en cognitieve controle
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC: DEC Utrecht Postadres: Postbus 85500 3508 GA Utrecht E-mailadres: dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: UU-ASC	Afdeling:	
Straat:	Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:	
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
E-mail: asc.factuur@uu.nl		

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

Ordernummer: CB.841910.3.01.011
------------------------------------

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?


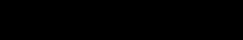

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven 2
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input type="checkbox"/>

## 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 de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	20 - 12 - 2022
Handtekening	



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de '*Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning*' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.1 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	PlayRisC – Spelen voor weerbaarheid en cognitieve controle

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Ondanks dat we het ons kunnen voorstellen dat spel belangrijk zal zijn voor kinderen en jonge zoogdieren is er nog maar **beperkt empirisch bewijs voor de rol van spel en de manier waarop spel de ontwikkeling van gedrag en de hersenen beïnvloedt**. De meeste kennis over de rol van spel in de ontwikkeling van hersenen en gedrag komt voort uit knaagdieronderzoek en dan met name onderzoek naar sociaal spelgedrag bij ratten (Vanderschuren & Trezza, 2014). Beperkingen in sociaal spel op jonge leeftijd leiden tot cognitieve stoornissen, zoals blijkt uit verminderde impulscontrole en besluitvorming bij ratten na sociale isolatie tijdens de ontwikkelingsperiode waarin sociaal spel het meest voorkomt, d.w.z. postnatale dag 21-42 (Panksepp,

1981), waarbij ratten in feite worden onthouden van sociaal speelgedrag. Deze effecten waren het meest uitgesproken onder uitdagende omstandigheden (Baarendse et al., 2013). Speelgedrag is ook in verband gebracht met het risico om op latere leeftijd verslavingsgedrag te ontwikkelen, dat eveneens wordt gekenmerkt door een verminderde cognitieve controle. Eerder toonden wij aan dat een gebrek aan spel de neiging om alcohol en cocaïne te gebruiken deed toenemen (Baarendse et al., 2014; Lesscher et al., 2015). Meer recent vonden wij dat individuen die vroeg in hun leven weinig speelgedrag vertonen, later in hun leven verlies van controle over alcoholgebruik ontwikkelen, terwijl dieren die veel sociaal speelgedrag vertonen, een hoge mate van controle over alcoholgebruik vertonen (Lesscher et al., 2021). Neurobiologisch weten we dat speldeprivatie leidt tot minder GABA-erge neurotransmissie in de prefrontale cortex (Bijlsma et al., 2022). Samen wijzen deze bevindingen erop dat speelgedrag tijdens de vroege ontwikkeling van groot belang is voor de ontwikkeling van cognitieve controle, en impliceren dat speelgedrag (sociaal maar ook risicovol spel) cruciaal is voor de stressbestendigheid en weerbaarheid tegen psychopathologie.

### ***Risicovol spel – waarom relevant en wat is er over bekend?***

Maar spel omvat meer dan alleen sociaal spel, denk bijvoorbeeld aan het spelen met objecten en risicovol spel in een omgeving die veel fysieke uitdagingen geeft. In tegenstelling tot sociaal spel is er nauwelijks empirisch onderzoek naar risicovol spel gedaan. Uit een aantal kleine casestudies blijkt bijvoorbeeld dat spelen in een natuurlijke omgeving – waarbij er sprake is van verschillende elementen van risicovol spel – het probleemoplossend vermogen en de weerbaarheid van kinderen kan vergroten (Harrison & Harrison, 2013), terwijl minder risicovol spel en minder buiten spelen in verband zijn gebracht met een lager gevoel van eigenwaarde en academische prestaties (Tremblay et al., 2015; Tremblay et al., 2011). Dit is interessant en relevant, aangezien westerse samenlevingen in toenemende mate risicomijdend zijn geworden. Kunnen beperkingen in (risicovol) spel bijdragen aan mentale gezondheidsproblemen? En omgekeerd kunnen meer mogelijkheden voor risicovol spel beschermen tegen mentale gezondheidsproblemen? Om deze vragen te beantwoorden is systematisch onderzoek nodig naar de invloed van risico's in spel op jonge leeftijd op de ontwikkeling van gedrag en de hersenen. Wij zijn de eerste groep die fundamenteel onderzoek doet naar de invloed van risicovol spel op de ontwikkeling van gedrag en de hersenen.

*Het doel van dit project is om fundamentele vragen over de rol van risicovol en sociaal spel in de ontwikkeling van gedrag en de hersenen te onderzoeken.*

*Centraal in dit project staat de hypothese dat spelgedrag, en in het bijzonder risicovol spelgedrag, essentieel is voor een optimale ontwikkeling van cognitieve controle en weerbaarheid tegen stress en psychopathologie in het latere leven, en dat de mediale prefrontale cortex hier een belangrijke rol bij speelt.*

De focus in dit project ligt op ***cognitieve controle als belangrijkste uitkomstmaat***, om meerdere redenen. Ten eerste komt uit ons onderzoek naar sociaal spel naar voren dat de meeste gedragsproblemen tot uiting komen in complexe en uitdagende situaties, suggererend dat spel belangrijk is voor de ontwikkeling van cognitieve controle (inhibitoire controle en cognitieve flexibiliteit) over gedrag. Ten tweede is cognitieve controle essentieel voor mens en dier om goed te kunnen functioneren in het dagelijks leven. Bovendien worden de meeste, zo niet alle, mentale aandoeningen in verband gebracht met een verminderde cognitieve controle. In de meeste experimenten gaan we naar de lange termijn effecten van spelmanipulaties kijken door dieren die al dan niet sociaal of risicovol gespeeld hebben op jonge leeftijd in de volwassenheid te testen op cognitieve controle (zie strategie). Naast dit cumulatieve effect van spel willen we ook weten of en hoe spel op de  korte termijn invloed kan hebben op cognitieve controle. Daarom willen we in een experiment drie groepen parallel aan elkaar trainen in een cognitieve controle taak, waarbij we een van de groepen tussen de cognitieve trainingen door risicovol spel aanbieden, een groep sociaal spel aanbieden en een derde groep geen spel aanbieden (zie strategie, experiment 1.2). Dit experiment biedt een ander perspectief op hoe spelervaring het gedrag in complexe cognitieve taken kan beïnvloeden.

We willen ook de ***invloed van stress*** meenemen in dit onderzoek. Recente theorieën over weerbaarheid tegen mentale gezondheidsproblemen suggereren dat herhaalde blootstelling aan tegenslagen (stress) de cognitieve flexibiliteit van een individu vormt, en dat dit essentieel is voor het vermogen van een individu om zich aan te passen aan stressvolle situaties in de toekomst (Bryce & Floresco, 2021; Cremer et al., 2021; Franklin et al., 2012; Gargiulo et al., 2020; Hadar et al., 2019; Sullivan et al., 2019). Daarom kijken we in dit

project steeds naar cognitieve controle als uitkomstmaat, maar willen we ook de invloed van herhaaldelijke blootstelling aan stress op cognitieve controle onderzoeken in dieren die al dan niet risicovol of sociaal hebben gespeeld op jonge leeftijd.

Daarnaast willen we ook functioneel onderzoek doen naar de **rol van de prefrontale cortex in cognitieve controle bij dieren die al dan niet risicovol of sociaal hebben gespeeld** op jonge leeftijd. Het is bekend dat vroege levenservaringen, waaronder sociale interacties maar ook stress, de structuur, functie en connectiviteit van de mPFC (mediale prefrontale cortex) beïnvloeden (Kolb et al., 2012), en daarmee mogelijk de ontwikkeling van cognitieve functies op latere leeftijd. De mPFC wordt geactiveerd tijdens sociaal speelgedrag (van Kerkhof et al., 2014) en verschillende farmacologische studies tonen aan dat de mPFC nodig is voor de expressie van sociaal speelgedrag (Achterberg et al., 2015; Bell et al., 2009; van Kerkhof et al., 2013; Vanderschuren et al., 2016). Bovendien is aangetoond dat deprivatie van spel structurele en functionele veranderingen veroorzaakt in de mPFC (Baarendse et al., 2013; Bijlsma et al., 2022; Burleson et al., 2016; Hermes et al., 2011; Himmler et al., 2018). Hoewel deze studies suggereren dat spel cognitieve controle zou kunnen beïnvloeden via effecten op de prefrontale cortex, is dit verband nog niet direct onderzocht en bewezen. Daarom gaan we in dit project met behulp van virale constructen en geavanceerde technieken de activiteit van mPFC neuronen meten én beïnvloeden tijdens een cognitieve controle taak in dieren die al dan niet sociaal of risicovol hebben gespeeld op jonge leeftijd. Deze aanpak is uniek en levert belangrijke inzichten op in hoe spel de ontwikkeling van gedrag én de hersenen beïnvloedt.

### **Risicovol spel onderzoek – modelkeuze en eerste bevindingen**

Volgens een Noorse onderzoeker bestaat risicovol spel bij kinderen bestaat uit zes elementen: grote hoogte, hoge snelheid, gevaarlijk gereedschap, gevaarlijke elementen, ruw (rough and tumble = sociaal spel zoals de ratten dat vertonen) spel en verdwijnen/verdwalen (Sandseter, 2007). Niet al deze elementen zijn in een diermodel te vatten, maar hoogte, snelheid en ruw spel wel. Om risicovol spel te modelleren (wij zijn de eerste onderzoeksgroep die hier naar kijkt) zullen wij daarom elementen van hoogte en snelheid introduceren (zie de afbeelding rechts in figuur 1). Uit pilotwerk naar dit model weten we inmiddels dat:

- (1) De ratten in deze opstelling gebruik maken van de hoogtes, en regelmatig zogenaamde stretched-attend postures aannemen, een veelgebruikte maat voor het verkennen van een potentieel risicovolle omgeving. Dit laat zien dat de risky play opstelling inderdaad leidt tot risicovol gedrag bij onze ratten.
- (2) Spel in deze risky play opstelling cognitieve controle over gedrag kan verbeteren.
- (3) Spel in deze risky play opstelling invloed heeft op de ontwikkeling van de prefrontale cortex (meer GABAerge neurotransmissie, in tegenstelling tot wat we eerder vonden voor spel deprivatie).

In zekere zin zou risicovol spel als een **vorm van kooiverrijking** gezien kunnen worden, maar er zijn wel grote verschillen:

- Kooiverrijking gaat uit van de reguliere kooien waarin de ratten worden gehuisvest, terwijl wij de verrijking in een aparte opstelling aanbieden, als een soort 'speelkwartier'
- Kooiverrijking wordt soms vanaf speenleeftijd geïntroduceerd en wordt vaak gehandhaafd gedurende het gehele experiment, maar nooit enkel gedurende de periode waarin ratten het meeste spelen zoals wij dat hier voorstellen.
- De methoden voor kooiverrijking lopen sterk uiteen, maar doorgaans worden speeltjes en tunnels aan de thuis-kooi toegevoegd, zoals we dat ook deels doen binnen onze reguliere onderzoeksprojecten. Daarnaast wordt ook gebruik gemaakt van papier, extra zaagsel etc. (Simpson & Kelly, 2011). Wat de risky play opstelling anders en uniek maakt zijn de hoogte, hangende en wiebelende onderdelen.
- Wat betreft de invloed van kooiverrijking is het opvallend dat in de meeste studies waarbij kooiverrijking vanaf de vroege ontwikkeling wordt toegepast, de focus ligt op de invloed van stress vroeg in het leven (zoals maternale deprivatie) op bijvoorbeeld cognitieve uitkomstmaten. Hierbij is vaak naar hippocampus-afhankelijke taken gekeken (Morris Water Maze bijvoorbeeld), maar soms is ook gebruik gemaakt van cognitieve taken waarbij de prefrontale cortex betrokken is, zoals reversal taken. Vaak zijn de effecten van kooiverrijking op zichzelf erg subtiel en blijkt kooiverrijking vooral de effecten van stress vroeg in het leven teniet doen of te verminderen (bijvoorbeeld do Prado et al., 2016; Schrijver et al., 2004). Dit in tegenstelling tot onze voorlopige resultaten, die laten zien dat risicovol spel cognitieve controle en de ontwikkeling van de prefrontale cortex kan beïnvloeden.

Kortom – de keuze van de type kooiverrijking (hoogtes, risicovolle materialen), de timing van de kooiverrijking (tijdens de spelperiode en niet in de thuiskooi) maakt de opzet van ons onderzoek heel anders en complementair aan de 'reguliere' verrijkingsstudies.

### 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Het overkoepelende doel van dit project is om:

De rol van spelgedrag in de ontwikkeling van cognitieve controle en stressbestendigheid te bestuderen, en de betrokkenheid van de mPFC bij deze processen te onderzoeken.

Voor dit onderzoek zullen we steeds vier condities met elkaar vergelijken die samen een continuüm van spelgedrag weerspiegelen, variërend van helemaal geen spel tot een combinatie van sociaal en risicovol spel, zoals geïllustreerd in Figuur 1:

- Geïsoleerde ratten zonder spel (No Play, NP)
- Sociaal gehuisveste ratten (Social Play, SP)
- Geïsoleerde ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk No Social Play, HR-SP)
- Sociaal gehuisveste ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk Social Play, HR+SP)

We hebben drie specifieke doelstellingen voor dit project:

(1) Het bepalen van de impact van (risico's in) spel op de ontwikkeling van cognitieve controle (type dierproef 1).

Als speelgedrag bijdraagt tot cognitieve controle over het gedrag, door het ervaren van risico's en conflicten tijdens het spelen, dan verwachten we dat dieren die tijdens hun vroege ontwikkeling gedeprimeerd zijn van spelgedrag beperkingen in cognitieve controle vertonen. Daarentegen verwachten we dat blootstelling aan sociaal én risicovol spel de cognitieve controle onder uitdagende omstandigheden juist zal verhogen. Wij verwachten dat deze verschillen in cognitieve controle vooral opvallen onder uitdagende en conflicterende omstandigheden, bijvoorbeeld situaties waarin dieren tegelijkertijd geconfronteerd worden met iets aantrekkelijks (een beloning) en een dreiging van iets aversiefs. Omdat bovendien gedacht wordt dat spel een rol speelt bij het leren door oefening met verschillende stimuli en omstandigheden, verwachten we tevens dat speelse episodes tussen trainingssessies voor cognitieve taken de cognitieve controle zullen verbeteren.

(2) Het bepalen van de invloed van (risico's in) spel op cognitieve controle onder (herhaalde) stress later in het leven (type dierproef 1).

Herhaaldelijke blootstelling aan stress kan schadelijke effecten hebben op onze cognitieve controle, maar sommige individuen zijn weerbaarder dan anderen (Arnsten, 2015; Franklin et al., 2012). Recente theorieën over stressbestendigheid suggereren dat herhaalde blootstelling aan tegenspoed de cognitieve flexibiliteit van een individu vormt, die essentieel is voor het vermogen om zich aan te passen. Wij verwachten dat ervaringen die jonge dieren opdoen tijdens spel belangrijk zijn voor het vermogen om cognitieve flexibiliteit te ontwikkelen. Als spelgedrag bijdraagt aan stressbestendigheid, dan zouden dieren die tijdens hun vroege ontwikkeling gedeprimeerd zijn van spelgedrag, blijvende stoornissen in cognitieve controle moeten vertonen bij herhaalde blootstelling aan stressvolle stimuli, terwijl ratten die het meest gespeeld hebben (sociaal en risicovol) naar verwachting een verbeterde cognitieve controle zullen laten zien bij herhaalde blootstelling aan stressvolle gebeurtenissen. Verder voorspellen wij dat ratten die risicovol en sociaal konden spelen tijdens de vroege ontwikkeling meer veerkracht zullen vertonen tegen onverwachte ongunstige gebeurtenissen, blijkend uit een normale respons op stress (angstniveaus en stresshormoonspiegels), terwijl ratten die beperkt zijn in hun spelmogelijkheden juist een overdreven respons op verschillende stressvolle stimuli vertonen, wat wijst op een verminderde veerkracht.

(3) Het bepalen van de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij cognitieve controle in relatie tot spelervaring en herhaalde stress (type dierproef 2).

Hoewel het bekend is dat de mPFC betrokken is bij zowel cognitieve controle als stressbestendigheid (Arnsten, 2015; Franklin et al., 2012), is het onduidelijk of de mogelijkheid tot risicovol sociaal spel op jonge leeftijd invloed heeft op de cellulaire eigenschappen en activiteiten van de mPFC op latere leeftijd, en of/hoe dit bijdraagt aan cognitieve controle en stressbestendigheid. Dit zullen we onderzoeken door (a) In vivo monitoring van mPFC-circuits tijdens cognitieve controletaken (met en zonder stress), (b) Ex vivo bepaling van de elektrofysiologische eigenschappen van het mPFC circuit en (c) Manipulatie van mPFC-circuits gedurende cognitieve controletaken (met en zonder stress). Voor dit onderzoek zullen wij ons met name richten op neuronen van de mPFC die projecteren naar de nucleus accumbens (NAc) omdat deze projecties een cruciale rol spelen in de cognitieve controle over beloning-gedreven gedrag (Block et al., 2007; Domingo-Rodriguez et al., 2020; Piao et al., 2017; Riga et al., 2014). We verwachten dat deprivatie van spel resulteert in veranderingen in de activiteit van de mPFC-NAc projectie bij ratten tijdens het uitvoeren van cognitieve taken, vergeleken met ratten die sociaal en/of risicovol hebben kunnen spelen. Verder verwachten we dat de impact van speldeprivatie op cognitieve controle wordt versterkt door herhaalde blootstelling aan stressvolle stimuli. Daarentegen zou het wel kunnen deelnemen aan spel, en in het bijzonder risicovol spel, moeten leiden tot een grotere betrokkenheid van de prefrontale cortex tijdens het uitvoeren van cognitieve taken op latere leeftijd. Tot slot verwachten we dat stimulatie van mPFC-NAc projecterende neuronen de cognitieve controle zal herstellen bij ratten die gedeprimeerd waren van spel (in het bijzonder bij stress), terwijl inhibitie van deze neuronen de cognitieve controle zal aantasten in de groep ratten die sociaal en risicovol heeft kunnen spelen.

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

We hebben alle expertise (ervaring met alle benodigde taken en technieken) en de benodigde apparatuur om de beschreven experimenten te kunnen uitvoeren. Bovendien is dit project gefinancierd door NWO (ENW-M2 grant: 1 AIO en 1 postdoc).

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet- en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

[Click or tap here to enter text.](#)

## 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Deze studie is van groot belang voor het begrijpen hoe vroege ervaring met of juist gebrek aan spel op jonge leeftijd bijdraagt aan de ontwikkeling van cognitieve controle mechanismen, die essentieel zijn voor individuen om in het dagelijkse leven optimaal te functioneren, maar ook voor de gevoeligheid voor psychopathologie. Het onderwerp van dit project is bijzonder actueel, omdat er veel zorgen zijn over de mentale gezondheid van jongeren (zie bijv. het [recente HBSC rapport](#) over mentale gezondheid van jongeren). Bovendien is de levensstijl van kinderen en adolescenten de afgelopen decennia steeds inactiever geworden, en zijn de mogelijkheden om vrij en risicovol te spelen enorm afgenomen (Gray, 2011; Little et al., 2012). Het is daarom van het grootste belang om de gevolgen van beperkingen in spelmogelijkheden voor de ontwikkeling van de hersenen en gedrag te begrijpen. Bovendien worden specifieke groepen kinderen, waaronder kinderen met een chronische ziekte, beperkt in hun mogelijkheden om te spelen. Inzicht in het effect van dergelijke speelbeperkingen enerzijds en blootstelling aan uitgebreide spelervaringen anderzijds zal essentieel zijn voor de preventie van geestelijke gezondheidsproblemen en voor het vormgeven van beleid om spelen te stimuleren en kinderen te helpen zich op volwassen leeftijd te ontplooien.

De betrokkenheid van de onderzoekers bij het consortium Healthy Play Better Coping (Nijhof et al., 2018), onderdeel van het strategische thema Dynamics of Youth van de Universiteit Utrecht, maakt een optimale vertaling en implementatie van de opgedane kennis mogelijk, waardoor de maatschappelijke impact van dit project wordt vergroot. Zij hebben ook samenwerkingen met collega's bij onder meer geowetenschappen, maar

ook met maatschappelijke partners zoals Jantje Beton die het mogelijk maken om in de toekomst (onder voorbehoud van financiering) ook parallel onderzoek naar de rol van risicovol spel bij kinderen te kunnen kijken. Deze complementaire aanpak zal ons meer inzicht geven in hoe spel en de risico's in spel bijdragen aan een gezonde ontwikkeling.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn kinderen en jongeren die op enigerlei wijze beperkt worden in de mogelijkheid te spelen met leeftijdsgenoten. Het is belangrijk dat er meer kennis komt over de impact van spel (beperkingen) op de ontwikkeling van hersenen en gedrag. Deze kennis zal helpen om volwassenen (ouders, leerkrachten, pedagogisch medewerkers, maar zeker ook beleidsmedewerkers, zorgverleners etc.) te overtuigen van de noodzaak om kinderen de ruimte te geven om vrij te spelen teneinde hen optimaal te laten ontwikkelen tot veerkrachtige volwassenen. Vanuit dat perspectief heeft de gehele maatschappij baat bij de kennis die voortkomt uit dit onderzoek.

Dit onderzoek zal veel nieuwe inzichten geven die ons als onderzoekers richting helpen geven aan toekomstig onderzoek zodat we steeds beter gaan begrijpen hoe de hersenen zich ontwikkelen in relatie tot complexe omgevingsfactoren zoals sociaal en risicovol spel. Bovendien zullen onze resultaten ook andere onderzoekers die zich bijvoorbeeld met stress en cognitie bezig houden helpen om de context van hun experimentele design verder te optimaliseren, bijvoorbeeld door spel te implementeren en daarmee cognitieve controle te verhogen.

Tot slot zijn ook de proefdieren belanghebbenden in dit project. De experimenten veroorzaken ongerief voor de dieren, en daarom hebben zij een negatief belang in dit project. Echter, dit onderzoek kan ook belangrijke positieve implicaties hebben voor het welzijn van gehouden (proef)dieren. Als onze resultaten zoals we verwachten laten zien dat (risicovol) spel bijdraagt aan een verhoogde weerbaarheid betekent dat ook dat gehouden dieren baat hebben bij huisvestingsystemen die sociaal en/of risicovol spel mogelijk maken.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Centraal in dit project staat dat we de rol van spelgedrag in de ontwikkeling van cognitieve controle over gedrag willen kunnen ontrafelen. Daarom vergelijken we voor vrijwel alle experimenten (behalve experiment 1.2, dat lichten we later toe) vier condities die een continuüm van spelgedrag weerspiegelen, variërend van helemaal geen spel tot een combinatie van sociaal en risicovol spel, zoals geïllustreerd in Figuur 1:

Geïsoleerde ratten zonder spel (No Play, NP)

Sociaal gehuisveste ratten (Social Play, SP)

Geïsoleerde ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk No Social Play, HR-SP)

Sociaal gehuisveste ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk Social Play, HR+SP)

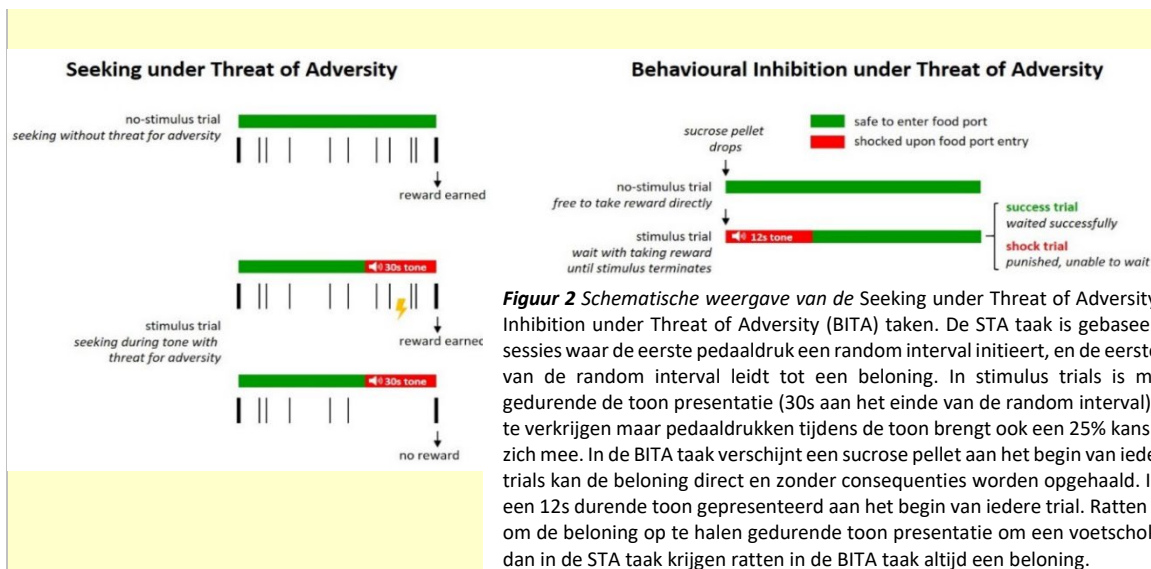
De NP en HR-SP groepen kunnen niet fysiek spelen omdat we een perspex tussenwandje in hun kooi plaatsen in de periode tussen 21 en 42 dagen, dit is de periode waarin sociaal spelgedrag maximaal is. Door het perspex tussenwandje kunnen de dieren elkaar zien, horen, ruiken, en kunnen de dieren ook fysiek dichtbij elkaar zijn, maar ze kunnen niet met elkaar spelen. Na deze periode worden alle dieren altijd sociaal gehuisvest tot ze op volwassen leeftijd getest worden. Er is dus geen sprake van algehele sociale deprivatie.

Risicovol spel bij kinderen wordt geacht zes elementen te omvatten: grote hoogte, hoge snelheid, gevaarlijk gereedschap, gevaarlijke elementen, ruw (rough and tumble = sociaal spel zoals we dat bij de rat ook zien) spel en verdwijnen/verdwalen (Sandseter, 2007). Om risicovol spel te modelleren (wij zijn de eerste onderzoeksgroep die hier naar kijkt) zullen wij daarom elementen van hoogte en snelheid introduceren (zie de afbeelding rechts in figuur 1). Uit pilotwerk weten we dat *de ratten in deze opstelling gebruik maken van de hoogtes, en regelmatig stretched-attend postures aannemen, een veelgebruikte maat voor het verkennen van een potentieel risicovolle omgeving. Dit geeft aan dat de **risky play opstelling ook daadwerkelijk als risicovol wordt ervaren** door de ratten.* Bovendien kunnen de ratten, door ze in groepen te huisvesten, ook sociaal (rough and tumble) spelen.



**Figuur 1** – Schematische weergave van de condities die we gebruiken om verschillende maten van spel te modelleren in de rat. No Play (NP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien zonder fysiek met elkaar te kunnen spelen; Social Play (SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen; High Risk no Social Play (HR-SP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien; deze dieren worden daarnaast dagelijks zonder kooigenoot in een opstelling met risky play elementen geplaatst; High Risk Social Play (HR+SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen en krijgen bovendien dagelijks samen met hun kooigenoten toegang tot een opstelling met risky play elementen. De foto rechts laat zien hoe de risky play opstelling in ons lab er in het echt uitziet.

Om het effect van blootstelling aan spel op cognitieve controle te bestuderen, zullen wij twee complementaire taken gebruiken die opgezet en gevalideerd zijn in ons team: de Seeking under the Threat of Adversity (STA)-taak en de Behavioural Inhibition under the Threat of Adversity (BITA)-taak (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2020; Verharen et al., 2019). In beide taken (zie figuur 2 voor illustraties) worden de ratten geconfronteerd met een conflict tussen beloning-gestuurd gedrag en een voorwaardelijke aversieve uitkomst. In de STA-taak moeten ratten een actie uitvoeren (d.w.z. op een pedaal drukken) om een beloning te verdienen, die een kans op bestraffing (milde elektrische voetschok) met zich meebrengt. Cognitieve controle in deze taak blijkt uit het vermogen om het zoeken naar de beloning in 'the face of adversity' te remmen. Bij de BITA-taak daarentegen moeten ratten een actie (het ophalen van een beloning) onderdrukken onder dreiging van aversie. Er zijn trials zonder geluid stimulus (waarbij er geen sprake is van een risico op bestraffing) en trials met geluid stimulus (met risico op bestraffing). Als de dieren gedurende de geluid stimulus de beloning ophalen krijgen ze een milde elektrische voetschok. In de BITA taak komt cognitieve controle dus tot uiting in het vermogen om te wachten met het ophalen van de beloning. Beide taken zijn zo opgezet dat ze geen uitgebreide training vereisen. Bovendien is het mogelijk om deze taken within-subjects uit te voeren. Doordat ze zowel 'geen stimulus' als 'stimulus' trials omvatten zijn de dieren hun eigen controle. Omdat we vermoeden dat risicovol spel ook invloed heeft op de ontwikkeling van de prefrontale cortex is het belangrijk om te vermelden dat de prefrontale cortex betrokken is bij cognitieve controle over gedrag in beide taken (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2019). Dit alles maakt beide taken uitermate geschikt voor dit onderzoek.



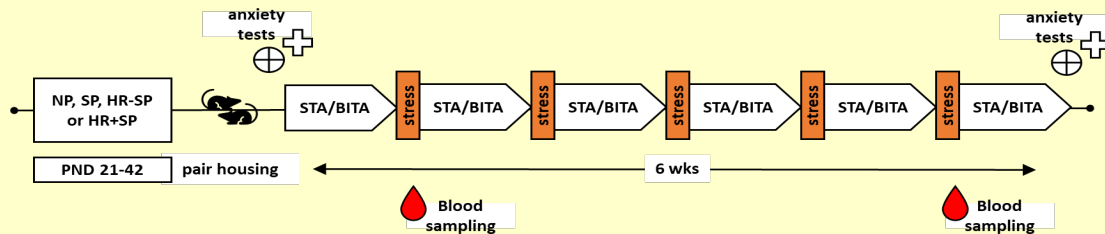
**Figuur 2** Schematische weergave van de Seeking under Threat of Adversity (STA) en Behavioural Inhibition under Threat of Adversity (BITA) taken. De STA taak is gebaseerd op random interval sessies waar de eerste pedaaldruk een random interval initieert, en de eerste pedaaldruk na afloop van de random interval leidt tot een beloning. In stimulus trials is minimaal 1 pedaaldruk gedurende de toon presentatie (30s aan het einde van de random interval) nodig om de beloning te verkrijgen maar pedaaldrukken tijdens de toon brengt ook een 25% kans op een voetschok met zich mee. In de BITA taak verschijnt een sucrose pellet aan het begin van iedere trial. In no-stimulus trials kan de beloning direct en zonder consequenties worden opgehaald. In stimulus trials wordt een 12s durende toon gepresenteerd aan het begin van iedere trial. Ratten moeten zich inhouden om de beloning op te halen gedurende toon presentatie om een voetschok te vermijden. Anders dan in de STA taak krijgen ratten in de BITA taak altijd een beloning.

**Experiment 1-1** Bepaalt het langetermijneffect van (risico's in) spelen op de ontwikkeling van cognitieve controle. Voor dit experiment zullen ratten vanaf postnatale dag 21 worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) om een spectrum van spelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal én risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Vervolgens zullen de ratten getraind worden voor ofwel de STA ofwel de BITA taak om het effect van de verschillen in blootstelling aan spel tijdens de vroege ontwikkeling op de cognitieve controle over het zoeken/nemen van beloning te bepalen.

**Experiment 1-2** Bepaalt de korte-termijn effecten van (risico's in) spel op de ontwikkeling van cognitieve controle. Naast de cumulatieve effecten van spel willen we ook weten of en hoe spel op de korte termijn invloed kan hebben op cognitieve controle. Daarom willen we in een experiment drie groepen parallel aan elkaar trainen in een cognitieve controle taak, waarbij we een van de groepen tussen de cognitieve trainingen door risicovol spel aanbieden, een groep sociaal spel aanbieden en een derde groep geen spel aanbieden. Voor dit experiment zullen ratten vanaf postnatale dag 21 getraind worden voor één van beide cognitieve controletaken (STA of BITA). De ratten worden allemaal individueel gehuisvest gedurende het hele experiment en worden verdeeld in drie groepen: één groep die tussen de cognitieve trainingssessies door risicovol kan spelen, één groep die tussen de cognitieve trainingssessies door sociaal kan spelen en één groep die helemaal niet kan spelen tussen de sessies door. De ratten worden 's ochtends (tussen 9 en 12 uur) getraind in de cognitieve taak. In de namiddag mogen de ratten in de sociale spelgroep met een andere rat spelen terwijl de ratten in de risicovolle spelgroep dan mogen spelen in een kooi met risicovolle spelattributen (zie figuur 1). Deze spelmomenten duren steeds 2 uur. De ratten in de 'geen-spel' groep worden in een andere kooi geplaatst, maar zonder sociale spelpartner of spelattributen. Door de verschillende groepen te vergelijken op hun respons in de STA- en BITA-taken, kunnen we de korte-termijn effecten van spelervaring op cognitieve controle beoordelen.

**Experiment 1-3** Bepaalt het effect van (risicovolle) spelervaring op cognitieve controle onder (herhaalde) stress. Voor dit experiment (zie Figuur 3 voor de proefopzet) worden ratten vanaf postnatale dag 21 toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie Figuur 1) om een spectrum van spelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen de groepen worden onderverdeeld in twee subgroepen. De stress subgroep zal herhaaldelijk aan restraint stress worden onderworpen, eenmaal per week gedurende 6 opeenvolgende weken (Friedman et al., 2017; Grafe et al., 2017). De controlegroep zal ongestoord in hun thuishok blijven, op reguliere kooiverschoning na. De ratten zullen getraind en getest worden op cognitieve controle, met behulp van de STA of BITA taak, voorafgaand aan en tussen de stress episodes in. Bij diezelfde dieren zullen we na de tweede en laatste blootstelling aan stress bloedmonsters nemen voor neuroendocriene metingen (corticosteron, ACTH, CRH). Bovendien zullen we de dieren testen in een open veld en op een elevated

plus maze (complementaire en eenvoudige gedragstesten) voor en na herhaalde blootstelling aan stress, om hun angstniveaus te meten.

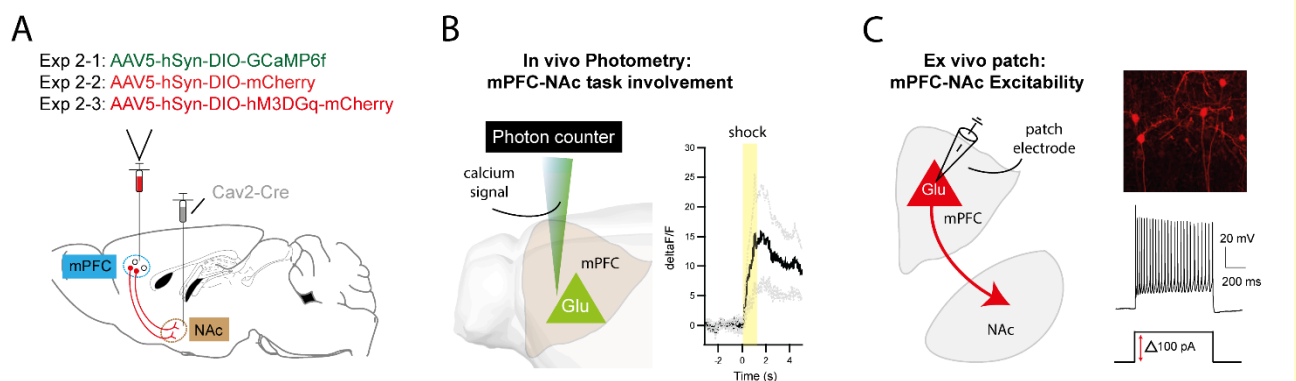


**Figuur 3** Opzet en tijdslijn voor experiment 1-3

## Type Dierproef 2 : Neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress

*NB We kiezen er bewust voor om eerst het gedrag goed in kaart te brengen in type dierproef 1, alvorens naar de neurobiologische processen te kijken in type dierproef 2. Indien we helemaal geen effect zien van risicovol spel op het gedrag in de STA taak maar wel in de BITA taak, zullen we ervoor kiezen de neurobiologische experimenten alleen voor de BITA taak uit te voeren.*

**Experiment 2-1** Vergelijkt de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij cognitieve controle in relatie tot verschillende maten van spelervaring en herhaalde blootstelling aan stress. De ratten zullen worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van spelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in random toegewezen paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen we Canine adenovirus 2 (Cav2)-Cre inbrengen in de NAc om retrograde Cre expressie te induceren in mPFC neuronen die naar de NAc projecteren. Bovendien wordt een adeno-geassocieerd virus (AAV) dat Cre-afhankelijke expressie van GCaMP calcium indicator aanstuurt, geïnfuseerd in de mPFC (figuur 4a) en worden optische vezels geïmplantatoerd om de mPFC te bereiken. Na herstel zullen de ratten worden getraind voor de STA of BITA taak. Tenslotte zullen calcium metingen worden uitgevoerd terwijl de ratten de cognitieve taken uitvoeren (figuur 4b, met bewijs van principe van fiber fotometrische opnames in mPFC cellen). Daarna, en vergelijkbaar met experiment 1-3, wordt de helft van de ratten in elke groep gedurende 6 weken eenmaal per week onderworpen aan restraint stress. De activiteit van mPFC-NAc neuronen zal vergeleken worden zowel tussen de groepen ( NP, SP, HR-SP en HR+SP) als binnen de groepen, d.w.z. voor en na de stress en in stimulus versus geen-stimulus trials.



**Figuur 4.** (A) Virale strategie om de mPFC-NAc pathway met behulp van fiber photometrie te kunnen monitoren (Exp 2-1), te visualiseren voor patch-clamp metingen (Exp 2-2) en met behulp van chemogenetica te manipuleren (Exp 2-3). (B) Voorlopige resultaten die, in muizen, fiber photometrische activiteitsmonitoring van mPFC neuronen gedurende een stressvolle ervaring (shock) laten zien. (C) Voorlopige data dat de visualisatie van mPFC-NAc neuronen laat zien (rood, rechtsboven) en een voorbeeld van een verkregen exciteerbaarheidsprofiel met actiepotentialen in reactie op een depolariserende stroomstap van 100 pA.

**Experiment 2-2** Vergelijkt de basale elektrofysiologische eigenschappen van mPFC-NAc projecterende neuronen in relatie tot verschillende spelervaringen en stressblootstelling. De ratten worden random toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van speelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Na postnatale dag 42 wordt in een stereotactische operatie een combinatie van Cav2-Cre in de NAc (om cre-recombinase tot expressie te brengen in mPFC neuronen) en een AAV in de mPFC die zorgt voor Cre-afhankelijke expressie van een fluorofoor (AAV-hSyn-DIO-mCherry; figuur 4a) geïnfuseerd. Hierdoor krijgen mPFC neuronen die projecteren naar de NAc een fluorescent label. Daarna worden ratten al dan niet blootgesteld aan herhaalde restraint stress (eenmaal per week gedurende 6 weken) (Friedman et al., 2017; Grafe et al., 2017). Daarna worden de dieren opgeofferd en worden patch-clamp metingen gedaan aan fluorescent gelabelde mPFC-NAc neuronen (figuur 4c voor proof of principle).

**Experiment 2-3** Maakt gebruik van DREADD technologie om selectief de activiteit van mPFC-NAc projecterende neuronen te moduleren om hun functionele bijdrage aan cognitieve controle te bepalen bij ratten met verschillende ervaringen met speelgedrag en/of herhaalde blootstelling aan stress. De ratten zullen worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van speelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen we Cav2-Cre inbrengen in de NAc om retrograde Cre expressie te induceren in mPFC neuronen die naar de NAc projecteren. Bovendien zal een AAV die een Cre-gevoelige hM4Di, een inhibitoire DREADD, of hM3Dq, een excitatoire DREADD, tot expressie brengt, in de mPFC worden toegediend (figuur 4a). Vervolgens worden de ratten getraind voor de STA of BITA taak en wordt clozapine N-oxide (CNO, de agonist voor de DREADD receptor) systemisch toegediend voorafgaand aan een STA of BITA sessie, om selectief de activiteit van mPFC-NAc projecterende neuronen te remmen of te stimuleren. De ratten krijgen op afwisselende dagen een vehicle injectie, en de volgorde van de injecties is voor ieder dier anders (volgens een latin-square design) zodat de dieren als hun eigen controle kunnen fungeren. Daarna wordt, zoals in experiment 1-3, de helft van de ratten in elke groep onderworpen aan herhaalde restraint stress. CNO en vehicle behandelingen tijdens de STA/BITA taak zullen worden herhaald na herhaalde blootstelling aan stress (vs controle) om de bijdrage van mPFC-NAc neuronen aan cognitieve controle te vergelijken bij ratten met verschillende ervaringen met spel én na herhaalde stress.

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De hierboven beschreven strategie gaat steeds uit van vier groepen die samen een spectrum van spelervaring beslaan: van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel.

In Type dierproef 1 staat de gedragskarakterisatie van deze vier spel groepen centraal. *Hiervoor gebruiken we twee in ons lab gevalideerde modellen voor cognitieve controle: het STA en het BITA model. De taken zijn eenvoudig en vergen geen lange training, maar zijn wel voldoende robuust en gevoelig om verschillen tussen condities en groepen te kunnen detecteren.* De vier groepen worden eerst gekarakteriseerd voor hun mate van cognitieve controle over gedrag. Vervolgens gaan we bepalen of herhaaldelijke blootstelling aan stress van invloed is op de mate van cognitieve controle, op een spel ervaring afhankelijke wijze. Daarnaast gaan we ook nog bepalen of spel tussen cognitieve training sessies bijdraagt aan de mate van cognitieve controle die de dieren in de verschillende taken laten zien.

In Type dierproef 2 staan de neurobiologische mechanismen centraal. Door gebruik te maken van in vivo calcium metingen en ex vivo elektrofysiologie kunnen we de activiteit van mPFC-NAc projecties in dieren die variëren in de mate van spel ervaring vergelijken. Vervolgens gebruiken we DREADD technologie om de activiteit van mPFC-NAc neuronen selectief te (in)activeren om de functionele rol van deze projecties in cognitieve controle in de verschillende spel groepen te kunnen vaststellen.

#### 3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer    Titel bijlage Beschrijving dierproef

1	<b>Invloed van spel ervaring op cognitieve controle, al dan niet in relatie tot stress</b>
2	<b>Neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress</b>
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.

## Literatuur referenties

- Achterberg, E. J., van Kerkhof, L. W., Damsteegt, R., Trezza, V., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2015). Methylphenidate and atomoxetine inhibit social play behavior through prefrontal and subcortical limbic mechanisms in rats. *The Journal of Neuroscience*, *35*(1), 161-169. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2945-14.2015> [doi]
- Arnsten, A. F. (2015). Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci*, *18*(10), 1376-1385. <https://doi.org/10.1038/nn.4087>
- Baarendse, P. J., Counotte, D. S., O'Donnell, P., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Early social experience is critical for the development of cognitive control and dopamine modulation of prefrontal cortex function. *Neuropsychopharmacology*, *38*(8), 1485-1494. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.47>; 10.1038/npp.2013.47
- Baarendse, P. J., Limpens, J. H., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2014). Disrupted social development enhances the motivation for cocaine in rats. *Psychopharmacology*, *231*(8), 1695-1704. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3362-8> [doi]
- Bell, H. C., McCaffrey, D. R., Forgie, M. L., Kolb, B., & Pellis, S. M. (2009). The role of the medial prefrontal cortex in the play fighting of rats. *Behav Neurosci*, *123*(6), 1158-1168. <https://doi.org/10.1037/a0017617>
- Bijlsma, A., Omrani, A., Spoelder, M., Verharen, J. P. H., Bauer, L., Cornelis, C., de Zwart, B., van Dorland, R., Vanderschuren, L., & Wierenga, C. J. (2022). Social play behavior is critical for the development of prefrontal inhibitory synapses and cognitive flexibility in rats. *J Neurosci*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0524-22.2022>
- Block, A. E., Dhanji, H., Thompson-Tardif, S. F., & Floresco, S. B. (2007). Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb Cortex*, *17*(7), 1625-1636. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl073>
- Bryce, C. A., & Floresco, S. B. (2021). Central CRF and acute stress differentially modulate probabilistic reversal learning in male and female rats. *Behav Brain Res*, *397*, 112929. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112929>
- Burleson, C. A., Pedersen, R. W., Seddighi, S., DeBusk, L. E., Burghardt, G. M., & Cooper, M. A. (2016). Social play in juvenile hamsters alters dendritic morphology in the medial prefrontal cortex and attenuates effects of social stress in adulthood. *Behav Neurosci*, *130*(4), 437-447. <https://doi.org/10.1037/bne0000148>
- Cremer, A., Kalbe, F., Gläscher, J., & Schwabe, L. (2021). Stress reduces both model-based and model-free neural computations during flexible learning. *NeuroImage*, *229*, 117747. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117747>
- do Prado, C. H., Narahari, T., Holland, F. H., Lee, H. N., Murthy, S. K., & Brenhouse, H. C. (2016). Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress. *Dev Psychobiol*, *58*(4), 482-491. <https://doi.org/10.1002/dev.21390>
- Domingo-Rodríguez, L., Ruiz de Azua, I., Dominguez, E., Senabre, E., Serra, I., Kummer, S., Navandar, M., Baddenhausen, S., Hofmann, C., Andero, R., Gerber, S., Navarrete, M., Dierssen, M., Lutz, B., Martín-García, E., & Maldonado, R. (2020). A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction. *Nat Commun*, *11*(1), 782. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14458-y>
- Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, *75*(5), 747-761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>
- Friedman, A., Homma, D., Bloem, B., Gibb, L. G., Amemori, K. I., Hu, D., Delcasso, S., Truong, T. F., Yang, J., Hood, A. S., Mikofalvy, K. A., Beck, D. W., Nguyen, N., Nelson, E. D., Toro Arana, S. E., Vorder Bruegge, R. H., Goosens, K. A., & Graybiel, A. M. (2017). Chronic Stress Alters Striosome-Circuit Dynamics, Leading to Aberrant Decision-Making. *Cell*, *171*(5), 1191-1205.e1128. [https://doi.org/S0092-8674\(17\)31239-4](https://doi.org/S0092-8674(17)31239-4) [pii]
- Gargiulo, A. T., Li, X., & Grafe, L. A. (2020). Assessment of Stress Effects on Cognitive Flexibility using an Operant Strategy Shifting Paradigm. *J Vis Exp*(159). <https://doi.org/10.3791/61228>

- Grafe, L. A., Cornfeld, A., Luz, S., Valentino, R., & Bhatnagar, S. (2017). Orexins Mediate Sex Differences in the Stress Response and in Cognitive Flexibility. *Biol Psychiatry*, *81*(8), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.013>
- Gray, P. (2011). The decline of play and the rise of psychopathology in children and adolescents. *American Journal of Play*, *3*(4), 443-463.
- Hadar, R., Edemann-Callesen, H., Hlusicka, E. B., Wieske, F., Vogel, M., Günther, L., Vollmayr, B., Hellweg, R., Heinz, A., Garthe, A., & Winter, C. (2019). Recurrent stress across life may improve cognitive performance in individual rats, suggesting the induction of resilience. *Transl Psychiatry*, *9*(1), 185. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0523-5>
- Hermes, G., Li, N., Duman, C., & Duman, R. (2011). Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats. *Physiol Behav*, *104*(2), 354-359. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.12.019>
- Himmler, B. T., Mychasiuk, R., Nakahashi, A., Himmler, S. M., Pellis, S. M., & Kolb, B. (2018). Juvenile social experience and differential age-related changes in the dendritic morphologies of subareas of the prefrontal cortex in rats. *Synapse*, *72*(4). <https://doi.org/10.1002/syn.22022>
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D. O., & Gibb, R. (2012). Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109* Suppl 2(Suppl 2), 17186-17193. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121251109>
- Lesscher, H. M. B., Achterberg, E. J. M., Siviyy, S. M., & Vanderschuren, L. (2021). Individual differences in social play behaviour predict alcohol intake and control over alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *238*(11), 3119-3130. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05929-1>
- Lesscher, H. M. B., Spoelder, M., Rotte, M. D., Janssen, M. J., Hesseling, P., Lozeman-van 't Klooster, J. G., Baars, A. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2015). Early social isolation augments alcohol consumption in rats. *Behavioural pharmacology*, *26*(7 Spec No), 673-680. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000165> [doi]
- Little, H., Sandseter, E. B. H., & Wyver, S. (2012). Early Childhood Teachers' Beliefs about Children's Risky Play in Australia and Norway. *Contemporary Issues in Early Childhood*, *13*(4), 300-316. <https://doi.org/10.2304/ciec.2012.13.4.300>
- Minnaard, A. M. (2020). *Loss of control over substance use: Preclinical studies into the behavioural and neural mechanisms of addiction* [Utrecht University].
- Nijhof, S. L., Vinkers, C. H., van Geelen, S. M., Duijff, S. N., Achterberg, E. J. M., van der Net, J., Veltkamp, R. C., Grootenhuys, M. A., van de Putte, E. M., Hillegers, M. H. J., van der Brug, A. W., Wierenga, C. J., Benders, M. J. N. L., Engels, R. C. M. E., van der Ent, C. K., Vanderschuren, L. J. M. J., & Lesscher, H. M. B. (2018). Healthy play, better coping: The importance of play for the development of children in health and disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *95*, 421-429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.024>
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental psychobiology*, *14*(4), 327-332. <https://doi.org/10.1002/dev.420140405> [doi]
- Piao, C., Deng, X., Wang, X., Yuan, Y., Liu, Z., & Liang, J. (2017). Altered function in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens links to stress-induced behavioral inflexibility. *Behav Brain Res*, *317*, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.017>
- Riga, D., Matos, M. R., Glas, A., Smit, A. B., Spijker, S., & Van den Oever, M. C. (2014). Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci*, *8*, 230. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00230>
- Sandseter, E. B. H. (2007). Categorising risky play—how can we identify risk-taking in children's play? *European Early Childhood Education Research Journal*, *15*(2), 237-252. <https://doi.org/10.1080/13502930701321733>
- Schrijver, N. C., Pallier, P. N., Brown, V. J., & Würbel, H. (2004). Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav Brain Res*, *152*(2), 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.016>
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res*, *222*(1), 246-264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002>

- Sullivan, L., Shaffer, H., Hill, C., & Del Arco, A. (2019). Time-dependent changes in cognitive flexibility performance during intermittent social stress: Relevance for motivation and reward-seeking behavior. *Behav Brain Res*, 370, 111972. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111972>
- van Kerkhof, L. W., Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Social Play Behavior in Adolescent Rats is Mediated by Functional Activity in Medial Prefrontal Cortex and Striatum. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.83>; 10.1038/npp.2013.83
- van Kerkhof, L. W., Trezza, V., Mulder, T., Gao, P., Voorn, P., & Vanderschuren, L. J. (2014). Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats. *Brain Struct Funct*, 219(4), 1181-1211. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0558-y>
- Vanderschuren, L. J., Achterberg, E. J., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 86-105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.025>
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Trezza, V. (2014). What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. *Current topics in behavioral neurosciences*, 16, 189-212. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2013\\_268](https://doi.org/10.1007/7854_2013_268) [doi]
- Verharen, J. P. H., Luijendijk, M. C. M., Vanderschuren, L., & Adan, R. A. H. (2020). Dopaminergic contributions to behavioral control under threat of punishment in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(6), 1769-1782. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05497-w>
- Verharen, J. P. H., van den Heuvel, M. W., Luijendijk, M., Vanderschuren, L., & Adan, R. A. H. (2019). Corticolimbic Mechanisms of Behavioral Inhibition under Threat of Punishment. *J Neurosci*, 39(22), 4353-4364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2814-18.2019>



## Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Titel dierproef
	1	<b>Invloed van spel ervaring op cognitieve controle, al dan niet in relatie tot stress</b>

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het overkoepelende doel van dit project is om de rol van spelgedrag bij de ontwikkeling van cognitieve controle en stressbestendigheid te bestuderen, en de betrokkenheid van de mediale prefrontale cortex (mPFC) in deze processen te onderzoeken. In dit deel van het project ligt de focus op "de invloed van spel ervaring op cognitieve controle, en de rol van stress".

Voor dit project zullen we steeds ratten (mannen en vrouwen) uit vier condities met elkaar vergelijken, die samen een continuüm van spelgedrag weerspiegelen, variërend van helemaal geen spel tot een combinatie van sociaal en risicovol spel, zoals geïllustreerd in Figuur 1:

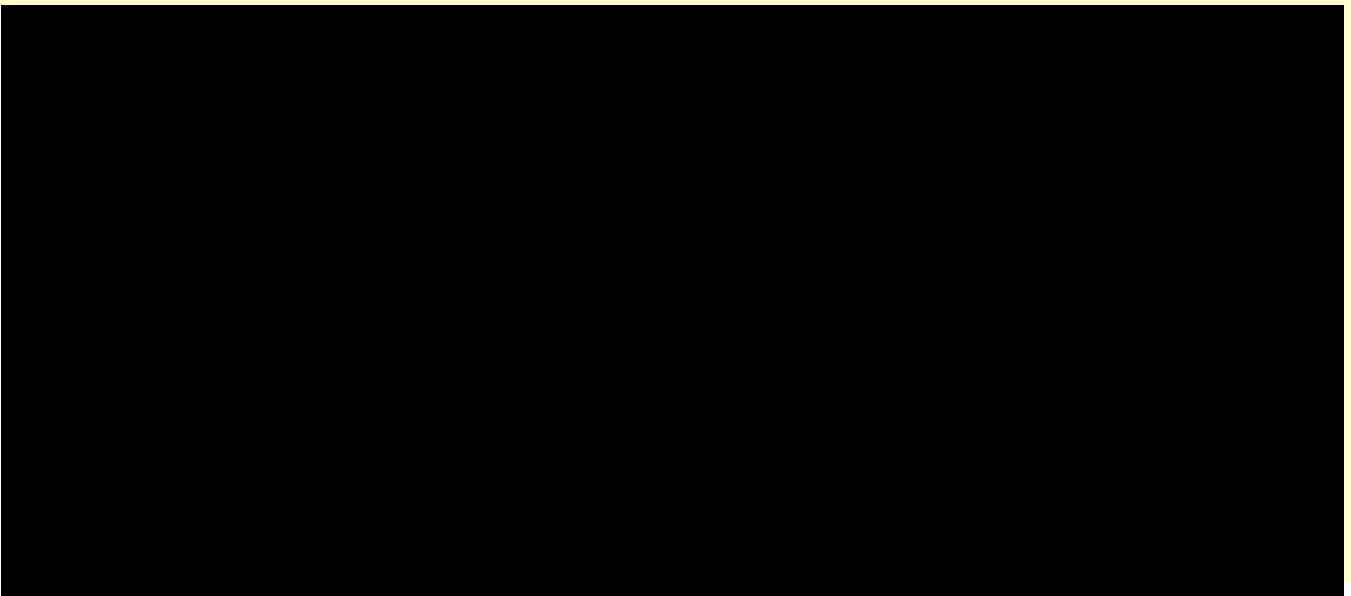
Geïsoleerde ratten zonder spel (No Play, NP)

Sociaal gehuisveste ratten (Social Play, SP)

Geïsoleerde ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk No Social Play, HR-SP)

Sociaal gehuisveste ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk Social Play, HR+SP)

Risicovol spel bij kinderen wordt geacht zes elementen te omvatten: grote hoogte, hoge snelheid, gevaarlijk gereedschap, gevaarlijke elementen, ruw (rough and tumble = sociaal spel zoals de ratten dat vertonen) spel en verdwijnen/verdwalen (Sandseter, 2007). Om risicovol spel te modelleren zullen wij daarom elementen van hoogte en snelheid introduceren (zie de afbeelding rechts in Figuur 1). Bovendien kunnen de ratten, door ze in groepen onder te brengen, ook sociaal kunnen spelen.



(NP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien zonder fysiek met elkaar te kunnen spelen; Social Play (SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen; High Risk no Social Play (HR-SP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien; deze dieren worden daarnaast dagelijks zonder kooigenoot in een opstelling met risky play elementen geplaatst; High Risk Social Play (HR+SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen en krijgen bovendien dagelijks samen met hun kooigenoten toegang tot een opstelling met risky play elementen. De foto rechts laat zien hoe de risky play opstelling in ons lab er in het echt uitziet.

Om het effect van blootstelling aan spel op cognitieve controle te bestuderen, zullen wij twee complementaire taken gebruiken die opgezet en gevalideerd zijn in ons team: de Seeking under the Threat of Adversity (STA)-taak en de Behavioural Inhibition under the Threat of Adversity (BITA)-taak (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2020; Verharen et al., 2019). In beide taken (zie figuur 2 voor illustraties) worden de ratten geconfronteerd met een conflict tussen beloningsgestuurd gedrag en een voorwaardelijke aversieve uitkomst. In de STA-taak moeten ratten een actie uitvoeren (d.w.z. op een pedaal drukken) om een beloning te verdienen, die een kans op bestraffing (milde elektrische voetschok) met zich meebrengt. Cognitieve controle in deze taak blijkt uit het vermogen om het zoeken naar de beloning in 'the face of adversity' te remmen. Bij de BITA-taak daarentegen moeten ratten een actie (het ophalen van een beloning) onderdrukken onder dreiging van aversie. Er zijn trials zonder geluid stimulus (waarbij er geen sprake is van een risico op bestraffing) en trials met geluid stimulus (met risico op bestraffing). Als de dieren gedurende de geluid stimulus de beloning ophalen krijgen ze een milde elektrische voetschok. In de BITA taak komt cognitieve controle dus tot uiting in het vermogen om te wachten met het ophalen van de beloning. Beide taken zijn zo opgezet dat ze geen uitgebreide training vereisen. Bovendien is het, in tegenstelling tot taken die we voorheen gebruikten, mogelijk om deze taken within-subjects uit te voeren, omdat we alle dieren testen in sessies met of zonder adversity (STA) en voor de BITA sessies waarin de helft van de trials stimulus danwel geen-stimulus trials zijn. Door alle dieren in beide condities (met of zonder risico op bestraffing) zullen de dieren functioneren als hun eigen controle. Omdat we vermoeden dat risicovol spel ook invloed heeft op de ontwikkeling van de prefrontale cortex is het belangrijk om te vermelden dat de prefrontale cortex betrokken is bij cognitieve controle over gedrag in beide taken (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2019). Dit alles maakt beide taken uitermate geschikt voor dit onderzoek.



variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal én risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Vervolgens zullen de ratten getraind worden voor ofwel de STA ofwel de BITA taak om het effect van de verschillen in blootstelling aan spel tijdens de vroege ontwikkeling op de cognitieve controle over het zoeken/nemen van beloning te bepalen. Dit experiment duurt maximaal 4 maanden.

**Experiment 1-2** Bepaalt de korte-termijn effecten van (risico's in) spel op de ontwikkeling van cognitieve controle. Naast de cumulatieve effecten van spel willen we ook weten of en hoe spel op de korte termijn invloed kan hebben op cognitieve controle. Daarom willen we in een experiment drie groepen parallel aan elkaar trainen in een cognitieve controle taak, waarbij we een van de groepen tussen de cognitieve trainingen door risicovol spel aanbieden, een groep sociaal spel aanbieden en een derde groep geen spel aanbieden. Voor dit experiment zullen ratten vanaf postnatale dag 21 getraind worden voor één van beide cognitieve controletaken (STA of BITA). De ratten worden allemaal individueel gehuisvest gedurende het hele experiment en worden verdeeld in drie groepen: één groep die tussen de cognitieve trainingssessies door risicovol kan spelen, één groep die tussen de cognitieve trainingssessies door sociaal kan spelen en één groep die helemaal niet kan spelen tussen de sessies door. De ratten worden 's ochtends (tussen 9 en 12 uur) getraind in de cognitieve taak. In de namiddag mogen de ratten in de sociale spelgroep met een andere rat spelen terwijl de ratten in de risicovolle spelgroep dan mogen spelen in een kooi met risicovolle spelattributen (zie figuur 1). Deze spelmomenten duren steeds 2 uur. De ratten in de 'geen spel' groep worden in een andere kooi geplaatst, maar zonder sociale spelpartner of spelattributen. Door de verschillende groepen te vergelijken op hun respons in de STA- en BITA-taken, kunnen we de korte-termijn effecten van spelervaring op cognitieve controle beoordelen. Dit experiment duurt maximaal 3,5 maanden.

**Experiment 1-3** Bepaalt het effect van (risicovolle) spelervaring op cognitieve controle onder (herhaalde) stress. Voor dit experiment (zie Figuur 3 voor de proefopzet) worden ratten vanaf postnatale dag 21 toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie Figuur 1) om een spectrum van speelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen de groepen worden onderverdeeld in twee subgroepen. De stress subgroep zal herhaaldelijk aan restraint stress worden onderworpen, eenmaal per week gedurende 6 opeenvolgende weken (Friedman et al., 2017; Grafe et al., 2017). De controlegroep zal ongestoord in hun thuishok blijven, op reguliere kooiverschoning na. De ratten zullen getraind en getest worden op cognitieve controle, met behulp van de STA of BITA taak, voorafgaand aan en tussen de stress episodes in. Bij diezelfde dieren zullen we na de tweede en laatste blootstelling aan stress bloedmonsters nemen voor neuro-endocriene metingen (corticosteron, ACTH, CRH). Bovendien zullen we de dieren testen in een open veld en op een elevated plus maze voor en na herhaalde blootstelling aan stress, om hun angstniveaus te meten. Dit experiment duurt maximaal 4 maanden.

### De spelgroepen

- De **NP groep** (geen spel) wordt geïsoleerd gehuisvest van postnatale dag 21 tot 42, door een perspex wandje in de kooi te plaatsen, waardoor ze de andere rat nog wel kunnen zien, horen en ruiken maar niet fysiek sociaal spel kunnen vertonen.
- De **SP groep** (sociaal spel) wordt in paren gehuisvest waardoor ze sociaal kunnen spelen gedurende de periode van postnatale dag 21 tot 42.
- De **HR-SP groep** (risicovol spel maar geen sociaal spel) wordt net als de NP groep geïsoleerd gehuisvest van postnatale dag 21 tot 42, door een perspex wandje in de kooi te plaatsen, waardoor ze de andere rat nog wel kunnen zien, horen en ruiken maar niet fysiek sociaal spel kunnen vertonen. Echter, ze kunnen in deze periode dagelijks gedurende 2 uur spelen in de risicovolle spel opstelling.
- De **HR+SP groep** (risicovol spel én sociaal spel) wordt in paren gehuisvest waardoor ze sociaal kunnen spelen gedurende de periode van postnatale dag 21 tot 42. Bovendien kunnen ze in deze periode dagelijks ook gedurende 2 uur spelen in de risicovolle spel opstelling, samen met hun kooigenoot.

## Operante conditionering

- De dieren worden 4-5 keer per week getraind om op een pedaal te drukken voor een beloning in een operante conditioneringstaak. Voor dit project zal sucrose de primaire beloner zijn. De duur van de training varieert van enkele weken tot max. 2 maanden, afhankelijk van de beloner en de taak.
- In de STA en de BITA taken worden de ratten geconfronteerd met een toon en milde elektrische voetschokken, waardoor de dieren een associatie leggen tussen de toon en het risico op milde elektrische voetschokken.
- In de STA en BITA taken kunnen de dieren milde elektrische voetschokken krijgen, die ze kunnen vermijden door af te zien van het drukken op een pedaal (STA) of door de beloning niet op te halen tijdens de toon presentatie (BITA).
- Voor deze experimenten is geen voedselrestrictie nodig.

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

De belangrijkste uitkomstparameters voor dit onderzoek zijn (1) het aantal pedaaldrukken dat de dieren maken tijdens de presentatie van de toon voor de STA taak en (2) het aantal stimulus trials waarin de dieren al dan niet een voetschok krijgen voor de BITA taak. Daarnaast zijn de neuroendocriene maten (corticosteron, ACTH, CRH niveaus in plasma) en de tijd / aantal bezoeken naar de open gedeeltes in de plus maze / open veld belangrijke uitkomstparameters.

De groepsgroottes zijn bepaald aan de hand van power analyses. Uitgaand van een effect size van 0.6 (Cohen's D), een within-subjects design en dus een repeated measures ANOVA met 4 experimentele groepen (NP, SP, HR-SP, HR+SP), een power van >80% en een alpha van 0.05 zijn max. 16 dieren per groep nodig. Dit is berekend met behulp van G\*power. De exacte aantallen per experiment worden per werkprotocol vastgesteld.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	rat	Geregistreerde leverancier	vanaf p21	864	man en vrouw	nee	Lister Hooded

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Ratten laten een karakteristieke vorm van sociaal spelgedrag (rough and tumble play of ravotten) zien dat ook bij kinderen en andere diersoorten vaak gezien wordt. Dit gedrag is bijzonder goed te herkennen en te kwantificeren. Daarnaast zijn ratten goed te trainen in cognitieve taken, wat belangrijk is voor het type experimenten dat we binnen dit project doen. Bovendien hebben we relevante modellen ontwikkeld voor cognitieve controle in Lister Hooded ratten, waarbij uitdagende condities worden aangeboden zoals het zoeken naar een beloning in de aanwezigheid van een aversieve stimulus.
Herkomst	Wij hebben goede ervaring met Charles River, vooral omdat de leeftijd van onze dieren zo nauwkeurig mogelijk moet worden bepaald. Charles River is doorgaans goed in het leveren van ratten van de juiste leeftijd.
Levensstadia	Voor dit onderzoek zijn jonge dieren nodig, omdat jonge dieren veel spelgedrag laten zien. De basis van dit onderzoek is dat we gaan onderzoeken hoe spel (of afwezigheid van spel) op jonge leeftijd bijdraagt aan de ontwikkeling van hersenen en gedrag.
Aantal	Voor experiment 1-1 gaan we uit van 4 condities (NP, SP, HR-SP, HR+SP), mannen + vrouwen en 2 taken. Met een N = 16 zijn dan $4 * 2 * 2 * 16 = 256$ dieren nodig.

	<p>Voor experiment 1-2 gaan we uit van 3 condities (NP, SP, HR) en 2 taken. Om de korte termijn effecten van spelervaring op cognitieve controle te onderzoeken krijgen de ratten al dan niet de mogelijkheid om te spelen (sociaal of risicovol) tussen de cognitieve trainingen door. Hierbij krijgt één groep geen mogelijkheid om te spelen (NP), krijgt één groep de mogelijkheid om sociaal te spelen (SP) en krijgt één groep de mogelijkheid om risicovol te spelen (HR). Met een N = 16 zijn dan <math>3 * 2 * 16 = 96</math> dieren nodig.</p> <p>Voor experiment 1-3 gaan we uit van 4 condities (NP, SP, HR-SP, HR+SP), 2 subgroepen (stress en geen stress), mannen + vrouwen en 2 taken. Met een N = 16 zijn dan <math>4 * 2 * 2 * 2 * 16 = 512</math> dieren nodig.</p> <p>In totaal zijn voor dit type dierproef <math>256 + 96 + 512 = 864</math> dieren nodig.</p>
Geslacht	<p>We onderzoeken in deze studie zowel mannen als vrouwen, aangezien het aannemelijk is dat spel relevant is voor beide geslachten. Echter, uit voorlopige resultaten uit recent onderzoek komt naar voren dat er wel degelijk verschillen zijn in de effecten van spel (deprivatie) op de ontwikkeling van de hersenen van vrouwelijke en mannelijke ratten, waarbij de effecten het meest uitgesproken zijn in mannen. Dat betekent dat we ieder experiment in zowel mannen als vrouwen zouden moeten doen. Experimenten 1-1 en 1-3 zijn gericht op de lange termijn invloed van spel ervaring op cognitieve controle terwijl experiment 1-2 een andere invalshoek heeft en gericht is op modulatie van cognitieve controle op de kortere termijn. We kiezen ervoor om experimenten 1-1 en 1-3 ook in vrouwen uit te voeren, maar alleen voor die experimenten waar we een duidelijk effect waarnemen in de mannen.</p>
Genetisch gewijzigd	Niet aan de orde.
Stam	Lister Hooded ratten zijn exploratief en makkelijk te trainen, en daardoor zeer geschikt voor complexe gedragstaken. We hebben veel ervaring met deze stam.

### C. Huisvesting en verzorging

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

Já

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

Een deel van de dieren (NP en HR-SP groepen en de dieren in experiment 1-2) moet (tijdelijk) geïsoleerd gehuisvest worden omdat we de invloed van sociaal spel en risicovol spel van elkaar willen kunnen onderscheiden (zie onder meer figuur 1 en de toelichting daarbij). Dit geldt voor de thuiskooi maar ook voor de momenten dat de dieren in de risicovolle spelopstelling worden geplaatst. Dit is nodig om de invloed van het niet sociaal kunnen spelen op de ontwikkeling van cognitieve controle en weerbaarheid te bepalen en is daarom inherent aan deze studie. De isolatie is voor de meeste experimenten tijdelijk (maximaal 3 weken voor experimenten 1.1 en 1.3), maar gedurende het gehele experiment voor experiment 1.2).

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De pijn die mogelijk door de handelingen (systemische injectie, bloedafname) wordt veroorzaakt is zodanig gering en kortdurend dat het ongerief als gevolg van het toedienen van een pijnstiller even hoog of hoger is dan de pijnprikkel van de handeling zelf.

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

Click or tap here to enter text.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Individuele huisvesting (om dieren te depriveren van sociaal spel tijdens de vroege ontwikkeling), milde elektrische voetschokken, herhaaldelijke restraint stress en bloedafnames kunnen nadelige gevolgen hebben voor het welzijn van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De genoemde factoren zijn inherent aan deze studie. Zoals gezegd is isolatie nodig om de invloed van het al dan niet kunnen spelen met soortgenoten op de ontwikkeling van cognitieve controle te kunnen bepalen. De elektrische voetschokken zijn nodig omdat we de dieren in een conflictsituatie willen brengen waarbij ze enerzijds zoeken naar een beloning en anderzijds rekening moeten houden met de risico's die ze lopen. Op basis van de literatuur hebben we sterke aanwijzingen dat spel met name invloed heeft op het functioneren van dieren onder dergelijke uitdagende condities. Dezelfde redenering geldt voor het belang om herhaaldelijke stress mee te nemen in dit onderzoek, zodat we kunnen onderzoeken of dieren die al dan niet gespeeld hebben op jonge leeftijd weerbaarder zijn tegen de invloeden van herhaaldelijke stress op hun cognitieve controle.

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

De ratten zullen zoveel mogelijk sociaal gehuisvest blijven. Slechts een deel van de dieren zal kortdurend (tijdens de vroege ontwikkeling tussen postnatale dag 21 en 42) geïsoleerd gehuisvest zijn om daarna weer sociaal met een leeftijdsgenoot gehuisvest te worden. Daarnaast zullen we de minimale schokintensiteit gebruiken die nodig is om een conflictsituatie te creëren die ons in staat stelt dieren te onderscheiden die controle versus controleverlies vertonen (gebaseerd op onze eerdere studies).

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Op basis van klinische symptomen (immobiliteit, verminderd reactievermogen, piloerectie) en in geval van aanzienlijk gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht ten opzichte van het voorgaande weegmoment in de voorafgaande week) zullen wij de dieren uit het onderzoek verwijderen.
- - Motorisch afwijkend gedrag en lethargie

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

Dit verwacht ik niet.

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We schatten het ongerief voor de dieren in deze studie in op hooguit matig (zie ook het overzichtsfiguur op pagina 3). Dit komt vooral vanwege de blootstelling aan milde elektrische voetschokken (hooguit matig), die inherent zijn aan de gedragstaken die alle dieren ondergaan. Wel is het belangrijk te benadrukken dat de voetschokken in principe te vermijden zijn voor de dieren. Daarnaast zal de blootstelling aan stress ook hooguit matig ongerief veroorzaken, en zullen de tijdelijke sociale isolatie (scheiding van een soortgenoot via een perspex tussenwandje), bloedafnames en korte gedragstesten licht ongerief veroorzaken. Alles bij elkaar komt het ongerief voor deze dieren daarmee op hooguit matig.

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	Vervanging is vanwege de complexiteit en de aard van de experimenten (speldeprivatie, specifiek ingrijpen in de mogelijkheid om deel te nemen aan spel, doseren van spel) niet mogelijk. Wel zijn we in gesprek met collega's van andere faculteiten om systematisch onderzoek op te zetten bij de mens waarbij we willen gaan kijken naar de mogelijkheden tot risicovol spel, en de mate waarin kinderen spelen in relatie tot hun weerbaarheid, cognitieve skills etc.
Vermindering	We maken zoveel mogelijk gebruik van within-subjects designs (door hier in het ontwerp van de cognitieve taken al rekening mee te houden) om het aantal dieren te beperken voor deze studie. Hierdoor wordt het aantal benodigde dieren met 50% gereduceerd.
Verfijning	Wegens de aard van de experimenten (dagelijkse training) zullen de dieren elke werkdag worden gezien door onze onderzoekers. Onze dieren zijn niet alleen gewend aan het hanteren vóór het begin van de experimenten, maar ook aan het hanteren tijdens de experimenten, waardoor de dieren minder stress ervaren. Individuele huisvesting is tot een minimum beperkt, en de dieren die sociaal geïsoleerd gehuisvest worden hebben nog wel de nabijheid van een leeftijdsgenoot die ze kunnen zien, horen en ruiken. Enkel de fysieke sociale spel interactie is niet mogelijk door het geplaatste perspex wandje. Overigens kan het spel in de risicovolle kooien gezien worden als verrijking, waardoor meer aan de gedragsbehoeften voor een deel van de ratten wordt voldaan ten opzichte van de reguliere huisvesting.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

[Click or tap here to enter text.](#)

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee > ga verder met vraag I.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Nee

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

[Click or tap here to enter text.](#)

## I. Herhaling

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

n.v.t.

## J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

### 3 Einde Experiment

#### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

De dieren zullen worden aangeboden voor hergebruik door andere wetenschappers of voor educatieve doeleinden (ongeveer 60%). Als dat niet mogelijk is, zullen we proberen deze dieren ter adoptie aan te bieden en anders via ATEX als orgaandonor aan te bieden (ongeveer 40%).

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Click or tap here to enter text.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Click or tap here to enter text.

Minnaard, A. M. (2020). *Loss of control over substance use: Preclinical studies into the behavioural and neural mechanisms of addiction* [Utrecht University].

Sandseter, E. B. H. (2007). Categorising risky play—how can we identify risk-taking in children's play? *European Early Childhood Education Research Journal*, 15(2), 237-252.

<https://doi.org/10.1080/13502930701321733>

Verharen, J. P. H., Luijendijk, M. C. M., Vanderschuren, L., & Adan, R. A. H. (2020). Dopaminergic contributions to behavioral control under threat of punishment in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(6), 1769-1782. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05497-w>

Verharen, J. P. H., van den Heuvel, M. W., Luijendijk, M., Vanderschuren, L., & Adan, R. A. H. (2019). Corticolimbic Mechanisms of Behavioral Inhibition under Threat of Punishment. *J Neurosci*, 39(22), 4353-4364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2814-18.2019>



## Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Titel dierproef
	2	<b>Neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress</b>

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het overkoepelende doel van dit project is om de rol van spelgedrag bij de ontwikkeling van cognitieve controle en stressbestendigheid te bestuderen, en de betrokkenheid van de mediale prefrontale cortex (mPFC) in deze processen te onderzoeken. In dit deel van het project ligt de focus op "De neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress".

Voor dit project zullen we steeds ratten (mannen en vrouwen) uit vier condities met elkaar vergelijken, die samen een continuüm van spelgedrag weerspiegelen, variërend van helemaal geen spel tot een combinatie van sociaal en risicovol spel, zoals geïllustreerd in Figuur 1 en ook uitgelegd in type dierproef 1:

Geïsoleerde ratten zonder spel (No Play, NP)

Sociaal gehuisveste ratten (Social Play, SP)

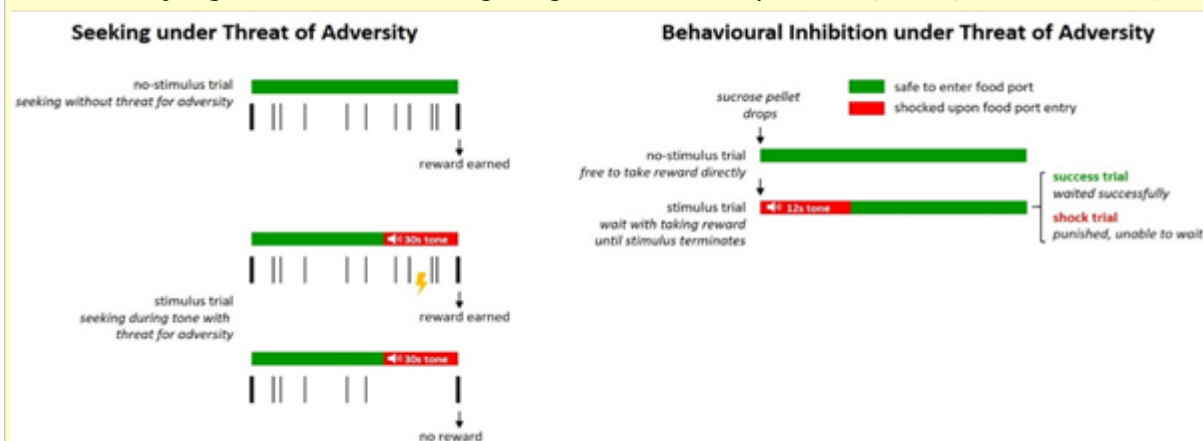
Geïsoleerde ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk No Social Play, HR-SP)

Sociaal gehuisveste ratten met toegang tot risicovolle spelelementen (High Risk Social Play, HR+SP)

Risicovol spel bij kinderen wordt geacht zes elementen te omvatten: grote hoogte, hoge snelheid, gevaarlijk gereedschap, gevaarlijke elementen, ruw (rough and tumble = sociaal spel zoals we dat bij de rat ook zien) spel en verdwijnen/verdwalen (Sandseter, 2007). Om risicovol spel te modelleren zullen wij daarom elementen van hoogte en snelheid introduceren (zie de afbeelding rechts in Figuur 1). Bovendien kunnen de ratten, door ze in groepen onder te brengen, ook sociaal kunnen spelen.

**Figure 1** - Schematische weergave van de condities die we gebruiken om verschillende maten van spel te modelleren in de rat. No Play (NP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien zonder fysiek met elkaar te kunnen spelen; Social Play (SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen; High Risk no Social Play (HR-SP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien; deze dieren worden daarnaast dagelijks zonder kooigenoot in een opstelling met risky play elementen geplaatst; High Risk Social Play (HR+SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen en krijgen bovendien dagelijks samen met hun kooigenoten toegang tot een opstelling met risky play elementen. De foto rechts laat zien hoe de risky play opstelling in ons lab er in het echt uitziet.

Om het effect van blootstelling aan spel op cognitieve controle te bestuderen, zullen wij twee complementaire taken gebruiken die opgezet en gevalideerd zijn in ons team: de Seeking under the Threat of Adversity (STA)-taak en de Behavioural Inhibition under the Threat of Adversity (BITA)-taak (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2020; Verharen et al., 2019). In beide taken (zie figuur 2 voor illustraties) worden de ratten geconfronteerd met een conflict tussen beloningsgestuurd gedrag en een voorwaardelijke aversieve uitkomst. In de STA-taak moeten ratten een actie uitvoeren (d.w.z. op een pedaal drukken) om een beloning te verdienen, die een kans op bestraffing (milde elektrische voetschok) met zich meebrengt. Cognitieve controle in deze taak blijkt uit het vermogen om het zoeken naar de beloning in 'the face of adversity' te remmen. Bij de BITA-taak daarentegen moeten ratten een actie (het ophalen van een beloning) onderdrukken onder dreiging van aversie. Er zijn trials zonder geluid stimulus (waarbij er geen sprake is van een risico op bestraffing) en trials met geluid stimulus (met risico op bestraffing). Als de dieren gedurende de geluid stimulus de beloning ophalen krijgen ze een milde elektrische voetschok. In de BITA taak komt cognitieve controle dus tot uiting in het vermogen om te wachten met het ophalen van de beloning. Beide taken zijn zo opgezet dat ze geen uitgebreide training vereisen. Bovendien is het mogelijk om deze taken within-subjects uit te voeren. Doordat ze zowel 'geen stimulus' als 'stimulus' trials omvatten zijn de dieren hun eigen controle. Daarnaast is de prefrontale cortex betrokken bij cognitieve controle over gedrag in beide taken (Minnaard, 2020; Verharen et al., 2019).



Om de effecten van herhaaldelijke stress op de integriteit en activiteit van neurale circuits die betrokken zijn bij cognitieve controle in dieren die verschillen in de mate van spel ervaring, zullen we gebruik maken van herhaaldelijke blootstelling aan restraint stress (Friedman et al., 2017; Grafe et al., 2017), zoals we dat ook voor type dierproef 1 al beschreven hebben.

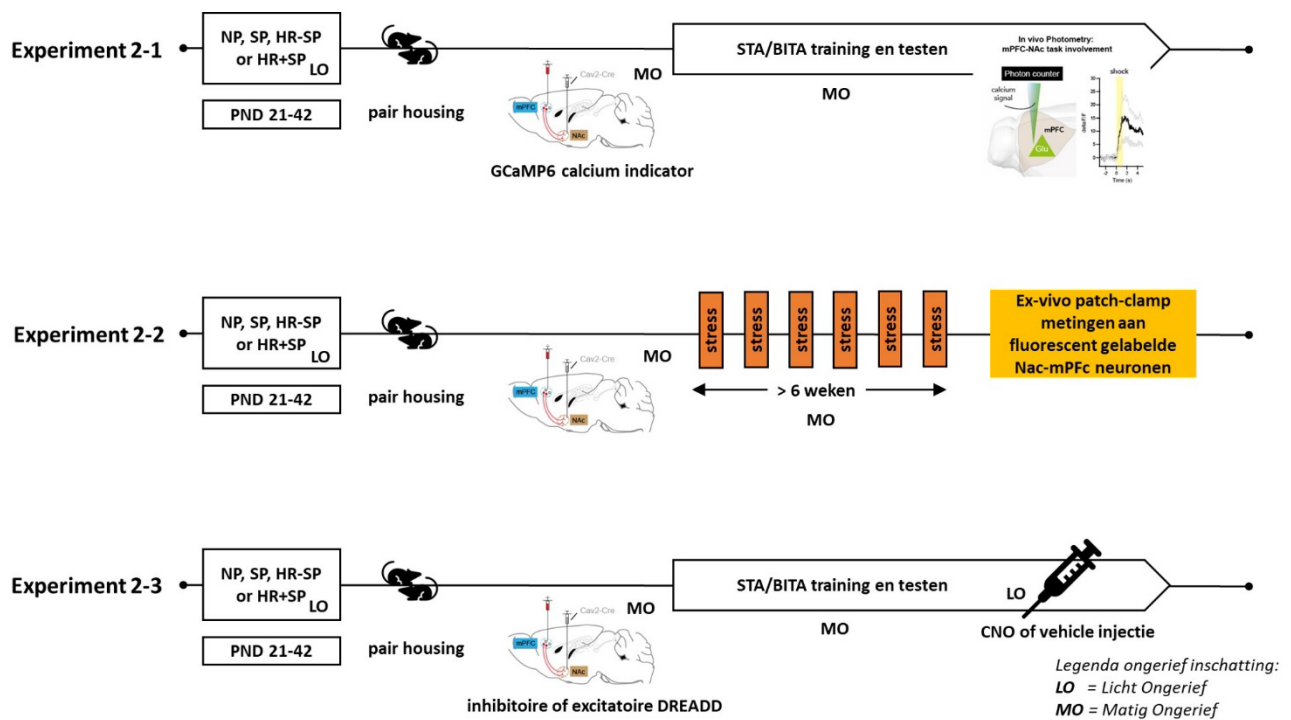
**Figuur 2** Schematische weergave van de Seeking under Threat of Adversity (STA) en Behavioural Inhibition under Threat of Adversity (BITA) taken. De STA taak is gebaseerd op random interval sessies waar de eerste pedaaldruk een random interval initieert, en de eerste pedaaldruk na afloop van de random interval leidt tot een beloning. In stimulus trials is minimaal 1 pedaaldruk gedurende de toon presentatie (30s aan het einde van de random interval) nodig om de beloning te verkrijgen maar pedaaldrukken tijdens de toon brengt ook een 25% kans op een voetschok met zich mee. In de BITA taak verschijnt een sucrose pellet aan het begin van iedere trial. In no-stimulus trials kan de beloning direct en zonder consequenties worden opgehaald. In stimulus trials wordt een 12s durende toon gepresenteerd aan het begin van iedere trial. Ratten moeten zich inhouden om de beloning op te halen gedurende toon presentatie om een voetschok te vermijden. Anders dan in de STA taak krijgen ratten

In dit type dierproef zullen we gebruik maken van verschillende virale constructen om de neurale circuits te bestuderen die betrokken zijn bij cognitieve controle, en hierbij de vergelijking te maken tussen groepen dieren die verschillen in de mate waarin en hoe ze kunnen spelen. Voor deze experimenten zijn operatieve ingrepen nodig waarbij een viraal construct wordt ingebracht in een specifiek hersengebied. In sommige gevallen wordt bovendien een optische vezel geïmplantéerd die het mogelijk maakt om activiteit van specifieke neuronen gedurende het uitvoeren van een cognitieve taak (STA of BITA) te monitoren met een hoge spatiele en temporele resolutie.

*NB We kiezen er bewust voor om eerst het gedrag goed in kaart te brengen in type dierproef 1, alvorens naar de neurobiologische processen te kijken in type dierproef 2. Indien we helemaal geen effect zien van risicovol spel op het gedrag in de STA taak maar wel in de BITA taak, zullen we ervoor kiezen de neurobiologische experimenten alleen voor de BITA taak uit te voeren.*

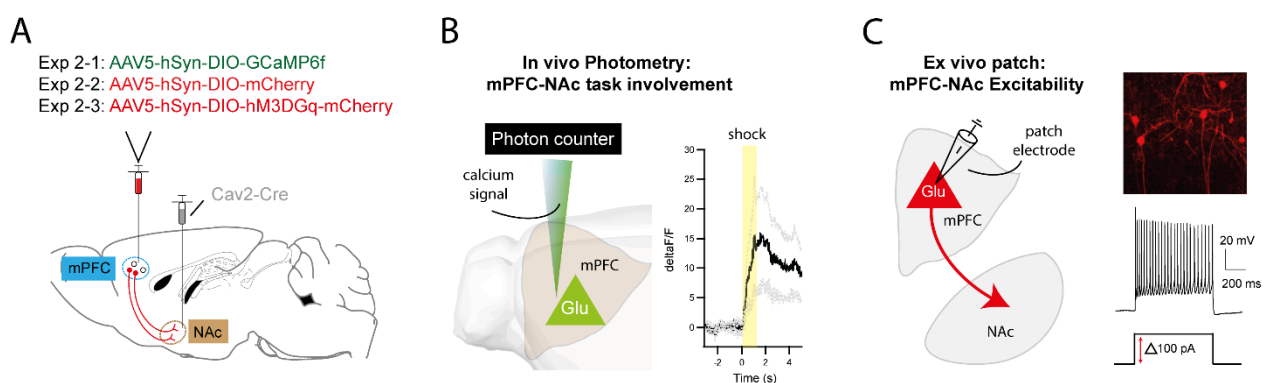
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

We zullen in dit type dierproef 3 experimenten uitvoeren, die als volgt worden samengevat en hieronder in meer detail worden toegelicht:



**Figuur 3.** Overzicht van de experimenten in type dierproef 2 met ongerief inschatting. De experimenten duren maximaal 5 maanden.

**Experiment 2-1** Vergelijkt de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij cognitieve controle in relatie tot verschillende maten van spelervaring en herhaalde blootstelling aan stress. De ratten zullen worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van speeldrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen we Canine adenovirus 2 (Cav2)-Cre inbrengen in de NAc om retrograde Cre expressie te induceren in mPFC neuronen die naar de NAc projecteren. Bovendien wordt een adeno-geassocieerd virus (AAV) dat Cre-afhankelijke expressie van GCaMP6 calcium indicator aanstuurt, geïnfuseerd in de mPFC (figuur 4a) en worden optische vezels geïmplanterd om de mPFC te bereiken. Na herstel zullen de ratten worden getraind voor de STA of BITA taak. Tenslotte zullen calcium metingen worden uitgevoerd terwijl de ratten de cognitieve taken uitvoeren (figuur 4b, met bewijs van principe van fiber fotometrische opnames in mPFC cellen). Daarna, en vergelijkbaar met experiment 1-3, wordt de helft van de ratten in elke groep gedurende 6 weken eenmaal per week onderworpen aan restraint stress. De activiteit van mPFC-NAc neuronen zal vergeleken worden zowel tussen de groepen ( NP, SP, HR-SP en HR+SP) als binnen de groepen, d.w.z. voor en na de stress en in stimulus versus geen-stimulus trials.



**Figuur 4.** (A) Virale strategie om de mPFC-NAc pathway met behulp van fiber photometrie te kunnen monitoren (Exp 2-1), te visualiseren voor patch-clamp metingen (Exp 2-2) en met behulp van chemogenetica te manipuleren (Exp 2-3). (B) Voorlopige resultaten die, in muizen, fiber photometrische activiteitsmonitoring van mPFC neuronen gedurende een stressvolle ervaring (shock) laten zien. (C) Voorlopige data dat de visualisatie van mPFC-NAc neuronen laat zien (rood, rechtsboven) en een

voorbeeld van een verkregen exciteerbaarheidsprofiel met actiepotentialen in reactie op een depolariserende stroomstap van 100 pA.

**Experiment 2-2** Vergelijkt de basale elektrofysiologische eigenschappen van mPFC-NAC projecterende neuronen in relatie tot verschillende spelervaringen en stressblootstelling. De ratten worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van speelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Na postnatale dag 42 worden de dieren sociaal gehuisvest en wordt in een stereotactische operatie een combinatie van Cav2-Cre in de NAc (om cre-recombinase tot expressie te brengen in mPFC neuronen) en een AAV in de mPFC die zorgt voor Cre-afhankelijke expressie van een fluorofoor (AAV-hSyn-DIO-mCherry; figuur 4a) geïnfuseerd. Hierdoor krijgen mPFC neuronen die projecteren naar de NAc een fluorescent label zodat we op een later tijdstip metingen kunnen doen aan deze neuronen. Daarna worden ratten al dan niet blootgesteld aan herhaalde restraint stress (eenmaal per week gedurende 6 weken) (Friedman et al., 2017; Grafe et al., 2017). Daarna worden de dieren opgeofferd en worden patch-clamp metingen gedaan aan fluorescent gelabelde mPFC-NAC neuronen (figuur 5a voor proof of principle). We contrasteren de PFC-NAC cellen met een andere belangrijke output van de PFC, die naar de amygdala, om het effect van stress op de PFC-NAC beter te kunnen duiden.

**Experiment 2-3** Maakt gebruik van DREADD technologie om selectief de activiteit van mPFC-NAC projecterende neuronen te moduleren om hun functionele bijdrage aan cognitieve controle te bepalen bij ratten met verschillende ervaringen met speelgedrag en/of herhaalde blootstelling aan stress. De ratten zullen worden toegewezen aan één van de vier verschillende condities (NP, SP, HR-SP en HR+SP, zie figuur 1) vanaf postnatale dag 21 om een spectrum van speelgedrag te genereren, variërend van geen spel, tot sociaal of risicovol spel, tot sociaal en risicovol spel. Vanaf postnatale dag 42 zullen de ratten allemaal onder vergelijkbare omstandigheden worden gehuisvest, d.w.z. in paren met een shelter en tissues als kooiverrijking. Daarna zullen we Cav2-Cre inbrengen in de NAc om retrograde Cre expressie te induceren in mPFC neuronen die naar de NAc projecteren. Bovendien zal een AAV die een Cre-gevoelige hM4Di, een inhibitoire DREADD, of hM3Dq, een excitatoire DREADD, of een controle eiwit (mCherry) tot expressie brengt, in de mPFC worden toegediend (figuur 4a). Vervolgens worden de ratten getraind voor de STA of BITA taak en wordt clozapine N-oxide (CNO, de agonist voor de DREADD receptor) systemisch toegediend voorafgaand aan een STA of BITA sessie (we kiezen voor dit experiment voor een van beide taken op geleide van de data uit type dierproef 1), om selectief de activiteit van mPFC-NAC projecterende neuronen te remmen of te stimuleren. De ratten krijgen op afwisselende dagen een CNO of een vehicle injectie, in een latin-square design zodat de dieren als hun eigen controle kunnen fungeren. Daarna wordt, zoals in experiment 1-3, de helft van de ratten in elke groep onderworpen aan herhaalde restraint stress. CNO en vehicle behandelingen tijdens STA/BITA taak instellingen zullen worden herhaald na herhaalde blootstelling aan stress (vs controle) om de bijdrage van mPFC-NAC neuronen aan cognitieve controle te vergelijken bij ratten met verschillende ervaringen met spel en na herhaalde stress.

### De spelgroepen

- De **NP groep** (geen spel) wordt geïsoleerd gehuisvest van postnatale dag 21 tot 42, door een perspex wandje in de kooi te plaatsen, waardoor ze de andere rat nog wel kunnen zien, horen en ruiken maar niet fysiek sociaal spel kunnen vertonen.
- De **SP groep** (sociaal spel) wordt in paren gehuisvest waardoor ze sociaal kunnen spelen gedurende de periode van postnatale dag 21 tot 42.
- De **HR-SP groep** (risicovol spel maar geen sociaal spel) wordt net als de NP groep geïsoleerd gehuisvest van postnatale dag 21 tot 42, door een perspex wandje in de kooi te plaatsen, waardoor ze de andere rat nog wel kunnen zien, horen en ruiken maar niet fysiek sociaal spel kunnen vertonen. Echter, ze kunnen in deze periode dagelijks gedurende 2 uur spelen in de risicovolle spel opstelling.
- De **HR+SP groep** (risicovol spel én sociaal spel) wordt in paren gehuisvest waardoor ze sociaal kunnen spelen gedurende de periode van postnatale dag 21 tot 42. Bovendien kunnen ze in deze periode dagelijks ook gedurende 2 uur spelen in de risicovolle spel opstelling, samen met hun kooigenoot.

### Operante conditionering

- De dieren worden 4-5 keer per week getraind om te responderen voor een beloning in een operante conditioneringstaak. Voor dit project zal sucrose de primaire beloner zijn, maar incidenteel zullen we mogelijk ook andere beloners willen kunnen onderzoeken zoals alcohol of een sociale partner. De duur van de training varieert van enkele weken tot max. 2 maanden, afhankelijk van de beloner en de taak.
- In de STA en de BITA taken worden de ratten geconfronteerd met een toon en milde elektrische voetschokken, waardoor de dieren een associatie leggen tussen de toon en het risico op milde elektrische voetschokken.
- In de STA en BITA taken kunnen de dieren milde elektrische voetschokken krijgen, die ze kunnen vermijden door af te zien van het drukken op een pedaal (STA) of door de beloning niet op te halen tijdens de toon presentatie (BITA).
- Voor deze experimenten is geen voedselrestrictie nodig.

### Stereotactische operaties

- Na postnatale dag 42 ondergaan de dieren een stereotactische operatie om virale vectoren te infuseren in het brein. Tijdens deze operaties, die in de regel niet langer dan twee uur/dier duren, worden zowel de retrograad acterende Cav2-Cre als de anterograad acterende AAVs geïnjecteerd (in mPFC). De precieze AAV is afhankelijk van het subexperiment (zie ook figuur 3 en verdere toelichting hierboven). In het geval van experiment 2-1 wordt er ook tijdens de operatie een optische vezel geplaatst aan de dorsale kant van de mPFC. De operaties vinden onder narcose plaats met pijnstilling voor, tijdens en na de operatie. Na de operatie hebben de dieren een herstelperiode van enkele weken (>3), waarin ook de aanmaak en het transport van de virale experimentele eiwitten plaatsvindt.

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

De belangrijkste uitkomstparameters voor dit onderzoek zijn:

Exp 2-1: Maximale amplitude van de calcium fluctuaties t.o.v. baseline

Exp 2-2: Actie potentiaal frequenties

Exp 2-3: Aantal pedaaldrukken dat de dieren maken tijdens de random interval en tijdens de presentatie van de toon voor de STA taak; en Aantal stimulus trials waarin de dieren een voetschok krijgen in de BITA taak.

De groepsgroottes zijn bepaald aan de hand van power analyses die gebaseerd zijn op onze eerdere ervaringen met dergelijke methodes. We richten ons op een power van 80%. Statistische tests zijn tweezijdig en met een alfawaarde van  $p=0.05$ . Op basis van ervaring verwachten we dat de data (log) normaal verdeeld zullen zijn en dit wordt getest met een KS test, zodat ook gevoeligere parametrische tests gebruikt kunnen worden. Voor Exp 2-1 en 2-3 kunnen meerdere metingen gemaakt worden in hetzelfde dier en die data worden met Repeated Measures ANOVA geanalyseerd, zodat het dierenaantal ook lager kan zijn dan anders het geval zou zijn.

De groepsgroottes zijn bepaald aan de hand van power analyses. Uitgaand van een effect size van 0.6 (Cohen's D), een within-subjects design en dus een repeated measures ANOVA met 4 experimentele groepen (NP, SP, HR-SP, HR+SP), een power van >80% en een alpha van 0.05 zijn max. 16 dieren per groep nodig. Dit is berekend met behulp van G\*power. De exacte aantallen per experiment worden per werkprotocol vastgesteld. Daarnaast moeten we rekening houden met 5% marge voor uitval van dieren door foutieve injecties tijdens de stereotaxie.

### B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
---------	-----------	----------	---------------	--------	----------	---------------------	------

1	rat	Geregistreer de leverancier	vanaf p21	952	man en vrouw	nee	Lister Hooded
Onderbouw de bovengenoemde keuzes.							
Diersoort	Ratten laten een karakteristieke vorm van sociaal spelgedrag (rough and tumble play of ravotten) zien dat ook bij kinderen en andere diersoorten vaak gezien wordt. Dit gedrag is bijzonder goed te herkennen en te kwantificeren. Daarnaast zijn ratten goed te trainen in cognitieve taken, wat belangrijk is voor het type experimenten die we binnen dit project doen. Bovendien hebben we relevante modellen ontwikkeld voor cognitieve controle in Lister Hooded ratten, waarbij uitdagende condities worden aangeboden zoals het zoeken naar een beloning in de aanwezigheid van een aversieve stimulus.						
Herkomst	Wij hebben goede ervaring met Charles River, vooral omdat de leeftijd van onze dieren zo nauwkeurig mogelijk moet worden bepaald. Charles River is doorgaans goed in het leveren van ratten van de juiste leeftijd.						
Levensstadia	Voor dit onderzoek zijn jonge dieren nodig, omdat jonge dieren veel spelgedrag laten zien. De basis van dit onderzoek is dat we gaan onderzoeken hoe spel (of afwezigheid van spel) op jonge leeftijd bijdraagt aan de ontwikkeling van hersenen en gedrag.						
Aantal	<p>Voor experiment 2-1 gaan we uit van 4 condities (NP, SP, HR-SP, HR+SP), 2 taken en 2 subgroepen (stress en geen stress). Uitgaande van 17 dieren per groep (16 + 5% i.v.m. uitval wegens foutieve virale infusies) hebben we voor dit experiment <math>4 \times 2 \times 2 \times 17 = 272</math> dieren nodig.</p> <p>Voor experiment 2-2 gaan we uit van 4 condities (NP, SP, HR-SP, HR+SP), 2 subgroepen (stress en geen stress) en 2 projecties van de mPFC (naar de NAc en de Amygdala). Uitgaande van 17 dieren per groep (16 + 5% i.v.m. uitval wegens foutieve virale infusies) hebben we voor dit experiment <math>4 \times 2 \times 2 \times 17 = 272</math> dieren nodig.</p> <p>Voor experiment 2-3 gaan we uit van 4 condities (NP, SP, HR-SP, HR+SP), 2 subgroepen (stress en geen stress) en 3 virale constructen (inhibitoire DREADD, excitatoire DREADD en controle eiwit mCherry). Uitgaande van 17 dieren per groep (16 + 5% i.v.m. uitval wegens foutieve virale infusies) hebben we voor dit experiment <math>4 \times 2 \times 3 \times 17 = 408</math> dieren nodig.</p> <p>In totaal hebben we voor dit type dierproef <math>272+272+408 = 952</math> dieren nodig.</p>						
Geslacht	Dit type dierproef is gericht op het verder onderzoeken van de neurobiologische processen die ten grondslag liggen aan de veranderingen in gedrag door verschillen in ervaring met spel. Vooralsnog kiezen we ervoor om dit uitsluitend in mannen te onderzoeken, hoewel we de ruimte willen hebben om op geleide van de resultaten in type dierproef 1 (bijvoorbeeld als de invloed van stress op spel gedepriiveerde dieren meer uitgesproken blijkt te zijn in vrouwen dan mannen) toch een deel van de experimenten in vrouwen te doen, maar uitsluitend voor experimenten waarbij we ook bij vrouwen een uitgesproken effect op gedrag vinden (type dierproef 1).						
Genetisch gewijzigd	Niet aan de orde.						
Stam	Lister Hooded ratten zijn exploratief en makkelijk te trainen, en daardoor zeer geschikt voor complexe gedragstaken. We hebben veel ervaring met deze stam.						

### C. Huisvesting en verzorging

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

Já

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

Een deel van de dieren (NP en HR-SP groepen) moet tijdelijk geïsoleerd gehuisvest worden omdat we de invloed van sociaal spel en risicovol spel van elkaar willen kunnen onderscheiden (zie onder meer figuur 1 en de toelichting daarbij). Dit geldt voor de thuiskooi maar ook voor de momenten dat de dieren in de risicovolle spelopstelling worden geplaatst. Dit is nodig om de invloed van het niet sociaal kunnen spelen op de ontwikkeling van cognitieve controle en weerbaarheid te bepalen en is daarom inherent aan deze studie. De isolatie is wel altijd tijdelijk, tijdens de volwassenheid worden alle dieren gewoon sociaal gehuisvest.

#### **D. Pijn en welzijnsaantasting**

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Click or tap here to enter text.

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

Voor de pijn die tijdens de operatie wordt ervaren gebruiken we injectie-anesthesie voor en tijdens de operatie, en analgesie voor, tijdens en na de operatie.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Individuele huisvesting (om dieren te depriveren van sociaal spel tijdens de vroege ontwikkeling), milde elektrische voetschokken, herhaaldelijke restraint stress en bloedafnames kunnen nadelige gevolgen hebben voor het welzijn van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De genoemde factoren zijn inherent aan deze studie. Zoals gezegd is isolatie nodig om de invloed van het al dan niet kunnen spelen met soortgenoten op de ontwikkeling van cognitieve controle te kunnen bepalen. De elektrische voetschokken zijn nodig omdat we de dieren in een conflictsituatie willen brengen waarbij ze enerzijds zoeken naar een beloning en anderzijds rekening moeten houden met de risico's die ze lopen. Op basis van de literatuur hebben we sterke aanwijzingen dat spel met name invloed heeft op het functioneren van dieren onder dergelijke uitdagende condities. Dezelfde redenering geldt voor het belang om herhaaldelijke stress mee te nemen in dit onderzoek, zodat we kunnen onderzoeken of dieren die al dan niet gespeeld hebben op jonge leeftijd weerbaarder zijn tegen de invloeden van herhaaldelijke stress op hun cognitieve controle.

De stereotactische operatie is een onvermijdelijke stap voor deze experimenten waarbij hersenfunctie wordt gemeten en/of gemanipuleerd. De operaties worden gedaan door experts om de impact op het welzijn van de dieren minimaal te houden en in onze ervaring tolereren de ratten het erg goed.

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

De ratten zullen zoveel mogelijk sociaal gehuisvest blijven. Slechts een deel van de dieren zal kortdurend (tijdens de vroege ontwikkeling tussen postnatale dag 21 en 42) geïsoleerd gehuisvest zijn om daarna weer sociaal met een leeftijdsgenoot gehuisvest te worden. Daarnaast zullen we de minimale schokintensiteit gebruiken die nodig is om een conflictsituatie te creëren die ons in staat stelt dieren te onderscheiden die controle versus controleverlies vertonen (gebaseerd op onze eerdere studies).

De stereotactische operaties worden uitgevoerd onder anesthesie, in combinatie met preoperatieve en postoperatieve analgesie. Extra zuurstof wordt toegediend indien de dieren moeite met ademen lijken te hebben tijdens de operatie (zeldzaam). Farmacologische reversie van anesthesie wordt toegepast nadat de operatie klaar is zodat de dieren niet onnodig lang onder narcose blijven (met derhalve onnodig risico op respiratoire stress). Na de operatie krijgen de dieren tijd om bij te komen in tijdelijke solitaire huisvesting. Ze krijgen extra nat voer aangeboden indien nodig geacht. De operaties worden altijd uitgevoerd door

gekwalificeerd personeel, in veel gevallen door analisten met vele jaren ervaring, en vaak ook in duo's in het geval van complexe operaties (bijvoorbeeld als er naast een virus ook een optische vezel wordt geplaatst).

### E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Op basis van klinische symptomen (immobiliteit, verminderd reactievermogen, pilo-erectie) en in geval van aanzienlijk gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht in de voorafgaande weken) zullen wij de dieren uit het onderzoek verwijderen.
- Motorisch afwijkend gedrag en lethargie
- Als het experimentele eindpunt niet meer bereikt kan worden. Dit geldt met name voor de experimenten waarbij optische vezels in de hersenen geïmplanteerd worden. Zodra een kapje op de schedel – en daarmee de optische vezel die op zijn plaats wordt gehouden door het kapje - loslaat van de schedel kan het experimentele eindpunt niet meer bereikt worden.

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

We rekenen met een risico van maximaal 4% op uitval door problematiek met de operaties. Vaak in dat geval in de vorm van peri-operatief overlijden en in mindere mate nadien.

### F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We schatten het ongerief voor de dieren in deze studie in op hooguit matig. Dit vanwege de stereotactische operaties die de dieren moeten ondergaan (hooguit matig), in combinatie met de blootstelling aan milde elektrische voetschokken (hooguit matig), die inherent zijn aan de gedragstaken die alle dieren ondergaan. Wel is het belangrijk te benadrukken dat de voetschokken in principe te vermijden zijn voor de dieren. Daarnaast zal de blootstelling aan stress ook hooguit matig ongerief veroorzaken, en zullen de dieren licht ongerief kunnen ervaren door de tijdelijke sociale isolatie (scheiding van een soortgenoot via een perspex tussenwandje), en de systemische injecties (zie ook het overzichtsfiguur 3 in deze bijlage). Alles bij elkaar komt het ongerief voor deze dieren daarmee op hooguit matig.

### G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	Vervanging is vanwege de complexiteit en de aard van de experimenten (speldeprivatie, specifiek ingrijpen in de mogelijkheid om deel te nemen aan spel, doseren van spel) niet mogelijk. Wel zijn we in gesprek met collega's van andere faculteiten om systematisch onderzoek op te zetten bij de mens waarbij we willen gaan kijken naar de mogelijkheden tot risicovol spel, en de mate waarin kinderen spelen in relatie tot hun weerbaarheid, cognitieve skills etc.
Vermindering	We maken zoveel mogelijk gebruik van within-subjects designs (door hier in het ontwerp van de cognitieve taken al rekening mee te houden) om het aantal dieren te beperken voor deze studie. Hierdoor wordt het aantal benodigde dieren met 50% gereduceerd.
Verfijning	Wegens de aard van de experimenten (dagelijkse training) zullen de dieren elke werkdag worden gezien door onze onderzoekers. Onze dieren zijn niet alleen gewend aan het

hanteren vóór het begin van de experimenten, maar ook aan het hanteren tijdens de experimenten, waardoor de dieren minder stress ervaren. Individuele huisvesting is tot een minimum beperkt, en de dieren die sociaal geïsoleerd gehuisvest worden hebben nog wel de nabijheid van een leeftijdsgenoot die ze kunnen zien, horen en ruiken. Enkel de fysieke sociale spel interactie is niet mogelijk door het geplaatste perspex tussenwandje. Overigens kan het spel in de risicovolle kooien gezien worden als verrijking, waardoor meer aan de gedragsbehoeften voor een deel van de ratten wordt voldaan ten opzichte van de reguliere huisvesting.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

[Click or tap here to enter text.](#)

### H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee > ga verder met vraag I.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Nee

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

[Click or tap here to enter text.](#)

### I. Herhaling

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

n.v.t.

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

[Click or tap here to enter text.](#)

## 3 Einde Experiment

### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Click or tap here to enter text.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Voor deze experimenten is het belangrijk dat we de locatie van de virusinjecties kunnen verifiëren. Voor experiment 2-2 geldt bovendien dat de metingen ex-vivo zijn en de dieren dus inherent aan het experiment gedood moeten worden.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee> Beschrijf de dodingsmethode

In Experiment 2-2 gaat dat door anesthesie gevolgd door decapitatie. In de andere experimenten gaat dat na anesthesie en vervolgens transcordiale perfusie met PBS.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Click or tap here to enter text.

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD10800202216665
2. Titel van het project : PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control
3. Titel van de NTS : Spelen voor weerbaarheid en cognitieve controle

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 23-12-2022  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 09-01-2023  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 17-01-2023/19-01-2023  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 25-01-2023

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

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 09-01-2023
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over het belang van het onderzoek, de achtergrond, de experimenten, de kooi in relatie tot risico en kooiverrijking. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 17-01-2023
- Datum antwoord: 19-01-2023

- Strekking gestelde vragen en antwoorden:
- *Projectvoorstel*

### 3.1 Achtergrond

Kunt u de inleiding inkorten waarbij minder de nadruk op het belang van buiten spelen en meer op het fundamentele onderzoek komt en kunt u herhalingen verwijderen? Tevens geeft u aan dat er weinig empirisch bewijs is. Kunt u met deze constatering beginnen in de aanvraag en aangeven wat er wel al bekend is?

*Omdat hier zoveel vragen over waren heb ik de achtergrond geheel herschreven. Ik heb nu benadrukt dat er weinig empirisch bewijs is voor de invloed van spel op de ontwikkeling van gedrag en de hersenen, en helemaal als het gaat om risicovol spel. Ik heb uiteengezet wat er wel bekend is en waar de kennis'gaten' zitten die we met dit project willen invullen.*

In de laatste alinea bij Achtergrond vermeldt u de wetenschappelijke onderbouwing. De DEC zou hier ook graag de rol van mPFC zien. Kunt u dit toevoegen?

*Tijdens de vergadering heb ik toegelicht dat gedrag de belangrijkste uitkomstmaat is, maar dat we ook het functionele verband tussen spel, cognitieve controle en de prefrontale cortex willen onderzoeken. Dit heb ik nader toegelicht, evenals de focus op stress in dit project (volgende punt). Ik vertrouw erop dat het zo veel duidelijker omschreven is.*

Onder (herhaalde) stress wordt in 1.3 de veerkracht getest. Dit is een vernieuwend aspect van het onderzoek. Kunt u ook de toegevoegde waarde van experiment 1.1 en 1.2 verder onderbouwen in de Achtergrond?

*De rationale om in dit project ook naar herhaalde stress te kijken verdween in een alinea die voornamelijk over de prefrontale cortex ging. In de achtergrond van de herschreven versie heb ik nu benadrukt dat de focus ligt op cognitieve controle als belangrijkste uitkomstmaat. Daarna heb ik toegelicht waarom we ook naar herhaaldelijke stress willen kijken, als ook naar de betrokkenheid van de prefrontale cortex (vorige punt). Ik vertrouw erop dat het zo duidelijker is waarom we herhaaldelijke stress willen meenemen in dit onderzoek.*

De dieren worden deels individueel gehuisvest. De gedachte is dat er na twee uur spelen voldoende sociale interactie is om isolatie op te heffen. Waarom wilt u dit suppletie experiment doen. Kunt u dit toelichten?

*\* Ik denk achteraf gezien dat de term suppletie verwarring heeft veroorzaakt, waarvoor mijn excuses. De rationale voor het experiment waar jullie op doelen (experiment 1.2) is om naast het cumulatieve (lange termijn) effect van spelmanipulaties op cognitieve controle ook te bestuderen hoe spelervaring op de korte termijn het gedrag in complexe cognitieve taken kan beïnvloeden. Dit biedt een ander perspectief op de rol van spel in de ontwikkeling van cognitieve controle, en is daarmee complementair aan de overige beschreven experimenten. Om de effecten van spelervaring op cognitie op korte termijn te kunnen vaststellen willen we in dit specifieke experiment drie groepen parallel aan elkaar trainen in een cognitieve controle taak. Hierbij willen we tussen de cognitieve trainingen door één van de groepen risicovol spel aanbieden, één groep sociaal spel aanbieden en een derde groep helemaal geen spel aanbieden (zie strategie, experiment 1.2). We verwachten dat deze kortstondige momenten van spelervaring tussen de cognitieve trainingen door de controle in opvolgende trainingssessies steeds verder zal verhogen.*

*In de achtergrond heb ik nu aangegeven dat de meeste experimenten gericht zijn op de lange termijn invloed van spelmanipulaties, en heb ik de rationale voor dit specifieke experiment en de hiervoor benodigde aanpak al toegelicht. In de strategie en het type dierproef 1 heb ik de tekst uiteraard ook aangepast en verduidelijkt.*

### 3.4 Strategie

De DEC heeft met u gesproken over kooiverrijking. In hoeverre zijn de trappen (figuur 1) in de kooi risicovol gedrag voor de rat, of is er gewoon sprake van kooiverrijking? De DEC vermoedt dat er veel literatuur over kooiverrijking en de ontwikkeling van het brein is. Kunt u referenties t.a.v. de kooiverrijking vermelden?

De DEC verwacht dat de rat niet altijd stress ervaart in de kooi. U heeft toegelicht dat de rat de kooi als risico ziet, niet alleen de wiebelende trap. Dit is gebaseerd op humane literatuur en observaties i.v.m. de transleerbaarheid. Het is van belang dat u zo goed mogelijk aannemelijk maakt dat u op deze manier de effecten van risicovol gedrag kunt onderzoeken (uw centrale vraag) en niet slechts naar de effecten van kooiverrijking an sich. Kunt u dit toevoegen in de aanvraag?

*Ik beantwoordt deze twee vragen even tegelijk omdat ze beiden over de modelkeuze en kooiverrijking gaan. In de herziene aanvraag, onder achtergrond, heb ik nu een alinea ingevoegd die geheel gaat over risicovol spel, en de modelkeuze. Daarin leg ik uit wat risicovol spel inhoudt en dat we op basis van de definitie van risicovol spel bij de mens keuzes hebben gemaakt voor ons diermodel. Daarnaast leg ik ook uit wat we tot nu toe uit ons pilot onderzoek hebben geleerd over dit model:*

- 1) *Dat de ratten in deze opstelling gebruik maken van de hoogtes, en regelmatig zogenaamde stretched-attend postures aannemen, een veelgebruikte maat voor het verkennen van een potentieel risicovolle omgeving. Dit laat zien dat de risky play opstelling inderdaad leidt tot risicovol gedrag bij onze ratten.*
- 2) *Dat spel in deze risky play opstelling cognitieve controle over gedrag kan verbeteren.*
- 3) *Dat spel in deze risky play opstelling invloed heeft op de ontwikkeling van de prefrontale cortex (meer GABAerge neurotransmissie, in tegenstelling tot wat we eerder vonden voor spel deprivatie).*

*Daarnaast heb ik een aparte volgende alinea ingevoegd die gericht is op de vergelijking van risky play en kooiverrijking (keuze aan materialen, maar ook de timing). Belangrijkste verschil is het gebruik van hoogte en risicovolle materialen, maar ook het feit dat wij de risicovolle context aanbieden als 'speelkwartier' en specifiek gedurende de periode waarin ratten het meeste spelgedrag vertonen. Dit maakt onze aanpak uniek en meer risky play dan kooiverrijking. In deze alinea beschrijf ik ook kort wat er bekend is over kooiverrijking en de ontwikkeling van cognitie en de hersenen, en dat blijkt allemaal heel summier en subtiel te zijn.*

### *Bijlage 1*

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In experiment 1.2 wordt direct met STA en BITA-taken getest, in 1.1 in een latere fase. Kunt u de reden daarvoor verduidelijken?

In experimenten 1.1 en 1.2 wordt resp. het langtermijneffect en het korte termijneffect van (risicovol) spelen op de ontwikkeling van cognitieve controle onderzocht. Kunt u de relatie tussen beide effecten verduidelijken?

*Dit heb ik reeds toegelicht onder een eerder punt (aangegeven met een \*). Uiteraard heb ik de toelichting in de bijlage ook verduidelijkt.*

B. Dieren: U vermeld bij de onderbouwing van aantallen dat u bij de experimenten 1.1 en 1.3 **uitgaat van 4** condities en bij 1.2 van 3 condities, zonder te vermelden waarom. De DEC verzoekt u om ook de onderbouwing te vermelden, omdat hier expliciet naar gevraagd wordt. *Ik heb nu onder B bij de onderbouwing van de aantallen bij 1.2 aangegeven welke condities er nodig zijn en waarom:*

*“Om de korte termijn effecten van spelervaring op cognitieve controle te onderzoeken krijgen de ratten al dan niet de mogelijkheid om te spelen (sociaal of risicovol) tussen de cognitieve trainingen door. Hierbij krijgt één groep geen mogelijkheid om te spelen (NP), krijgt één groep de mogelijkheid om sociaal te spelen (SP) en krijgt één groep de mogelijkheid om risicovol te spelen (HR).”*

C. Huisvesting en verzorging: De dieren verblijven in de speciale kooi gedurende 2 uur per dag. U heeft aangegeven dat de dieren dan alleen of met meerdere dieren zijn. Kunt u dit toevoegen (en daarbij enige uitleg geven)?

*Ik heb de toelichting uitgebreid en hierbij aangegeven dat de isolatie van de NP en de HR-SP groep ook geldt voor de momenten waarop de dieren in de risicovolle spelopstelling worden geplaatst. Daarnaast hadden we het in de vergadering ook over de legenda bij figuur 1 (in het projectvoorstel én in de bijlagen), waarin ik een schematische weergave geef van de verschillende groepen. Ik heb die legenda nu uitgebreid om beter toe te lichten wat er precies met de verschillende groepen gebeurt:*

*“Schematische weergave van de condities die we gebruiken om verschillende maten van spel te modelleren in de rat. No Play (NP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien zonder fysiek met elkaar te kunnen spelen; Social Play (SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen; High Risk no Social Play (HR-SP) = ratten worden gehuisvest met een perspex wandje via welke ze elkaar kunnen horen, ruiken en zien; deze dieren worden daarnaast dagelijks zonder kooigenoot in een opstelling met risky play elementen geplaatst; High Risk Social Play (HR+SP) = ratten kunnen met soortgenoten spelen en krijgen bovendien dagelijks samen met hun kooigenoten toegang tot een opstelling met risky play elementen. De foto rechts laat zien hoe de risky play opstelling in ons lab er in het echt uitziet.”*

E. Humane eindpunten: U geeft aan dat <0.1% van de dieren een HEP kan bereiken (zeer kleine kans). De DEC trekt daaruit de conclusie dat u dit dus niet verwacht. Wilt u dit toevoegen? *Ja, toegevoegd.*

## *Bijlage 2*

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In bijlage 2 wordt de exciteerbaarheid van neuronen bestudeerd. De DEC vraagt zich af of de *elektrische* exciteerbaarheid van de cellen een relevante parameter is omdat de cellen *in vivo* waarschijnlijk *chemisch* (door afgifte van neurotransmitters) geëxciteerd worden. Beide kunnen onafhankelijk

van elkaar veranderen. Kunt u beargumenteren waarom u wel de elektrische en niet de chemische exciteerbaarheid van de cellen meet en aangeven wat de relevantie van de gemeten resultaten is?

*We zijn ons ervan bewust dat er globaal gezien twee belangrijke determinanten zijn van activiteit van hersencellen:*

*1. De intrinsieke celmembraaneigenschappen van de cel (bijv de membraanweerstand en vuurdrempel).*

*2. De balans en sterkte van een verscheidenheid aan (synaptische) inputs op de cel. Met in het bijzonder ionotrope excitatoire en inhibitoire signalen (en verder uiteraard vele modulerende factoren).*

*Uiteraard is het op langere termijn mogelijk wenselijk om ook het enorme scala aan mogelijke relevante modulerende factoren te bestuderen (van dopamine, noradrenaline, glucocorticoiden, cannabinoïden, opioden tot corticotropin releasing factor, via al hun verschillende receptorsubtypes). Echter, voordat die mate van verdieping wordt gezocht, moet eerst een solide basis worden gelegd door te bepalen of de hoofddeterminanten veranderd zijn of niet. Daarom beginnen we daarmee.*

*Onze hier voorgestelde patch clamp experimenten kijken vooral naar de belangrijkste intrinsieke biofysische eigenschappen van de cel, ontleend aan de uitkomst van de elektrische stimulatie van cellen. Dit bootst niet direct een synaptische input na, maar geeft wel cruciale informatie over hoe de cel die synaptische inputs kan interpreteren. Daarnaast nemen we ook in dezelfde meting (daar waar mogelijk) als secundaire maat mee hoe sterk de meest prominente excitatoire synaptische input op de cel is (AMPA receptor gemedieerde glutamaterge input), om te zien of dit veranderd is. Samen geeft dit dus inzicht in twee belangrijke determinanten van activiteit (celintrinsiek en excitatoir synaptisch). Het is experimenteel gezien niet praktisch haalbaar om in een en dezelfde meting, op efficiënte wijze, alle mogelijke relevante factoren in een keer mee te nemen. Zie ook eventueel onze review die, in de behandeling van de rol van gekozen interne patch oplossingen, naar dit punt refereert (Linders et al., 2022 PMID: 36232917).*

D. Pijn en welzijnsaantasting

De dieren krijgen anesthesie. Kunt u toevoegen om welke vorm van anesthesie het gaat?

*Ja, zoals tijdens de vergadering besproken heb ik nu aangegeven dat het om injectie-anesthesie gaat.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het doel van dit project is onderzoek naar de invloed van risicovol spelgedrag op de prefrontale cortex in de hersenen en cognitief gedrag later in het leven. De hypothese is dat (langdurig) risicovol spelgedrag gedurende de jeugd een positief effect heeft op de ontwikkeling van de mediale prefrontale cortex (mPFC) wat resulteert in meer cognitieve controle en een hogere weerbaarheid tegen stress. Dit fundamentele neurobiologische- en gedragsonderzoek, als onderdeel van een consortium, gaat over een bekend maatschappelijk vraagstuk. Kinderen komen te weinig buiten (o.a. vanwege de risico's die dat in een stedelijk omgeving met zich meebrengt) en er is een tendens zichtbaar om elk risico dat kinderen zouden kunnen lopen zoveel mogelijk uit te bannen.

Om dit vraagstuk te onderzoeken heeft het project drie subdoelen, verdeeld over twee typen dierproeven met meerdere experimenten: het bepalen van de impact van (risico's in) spel op de ontwikkeling van cognitieve controle, het bepalen van de invloed van (risico's in) spel op cognitieve controle tijdens volwassenheid onder (herhaalde) blootstelling aan stress en het bepalen van de betrokkenheid van de prefrontale cortex bij cognitieve controle in relatie tot spelervaring en herhaalde blootstelling aan stress. Het spelgedrag wordt bij jonge ratten in vier condities (en in één experiment in drie condities) met elkaar vergeleken: geïsoleerde ratten zonder spel, sociaal gehuisveste ratten, geïsoleerde ratten welke ook solitair toegang tot risicovolle spelelementen krijgen en sociaal gehuisveste ratten welke gezamenlijk toegang krijgen tot de risicovolle spelelementen. Het spelen, dan wel sociaal, dan wel met toegang tot de risicovolle spelelementen (of beide), is 5x per week gedurende twee uur/sessie. De cognitieve controle wordt gemeten door de ratten gedragstaken te laten uitvoeren in een conflictsituatie. De betrokken neurobiologische processen worden post mortem / *ex vivo* gemeten en tevens worden fluorescente probes tot expressie gebracht waarmee activiteit van de mPFC neuronen met geïmplanteerde optische vezels *in vivo* kan worden geregistreerd. Bloedmonsters worden gebruikt om de (mate van) stress te kwantificeren. Effecten van stress op cognitieve controle worden in gedragsexperimenten gemeten.

De aanvraag komt het meest overeen met voorbeeld 3A uit de Handreiking "Invulling Definitie Project" waarbij de experimenten ieder een andere focus hebben maar ieder afzonderlijk duidelijk bijdragen aan het behalen met de hoofddoelstelling.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is de invloed van risicovol spelgedrag op de ontwikkeling van cognitieve controle en stressbestendigheid op latere leeftijd te bestuderen, en de betrokkenheid van de mediale prefrontale cortex hierbij te onderzoeken. Het uiteindelijke doel van het project

is beter te begrijpen hoe de vroege ervaring met risicovol spel (of het ontbreken daarvan) bijdraagt aan de ontwikkeling van cognitieve controle mechanismen, benodigd om optimaal te kunnen functioneren en mentaal gezond te zijn. Tevens wil men onder gecontroleerde omstandigheden wetenschappelijk bewijs leveren (en niet alleen observationeel humaan bewijs) voor het belang van risicovol spel (buiten spelen) op jeugdige leeftijd voor o.a. de veerkracht op latere leeftijd. Hierdoor kunnen (overheids)beleidsmedewerkers, kinderopvangcentra en ouders goed onderbouwde beslissingen nemen over bijvoorbeeld de wijze waarop zij omgaan met kinderen en over de inrichting van de openbare ruimte. De DEC heeft gediscussieerd over de fundamenteel-ethische vraag of voor onderzoek naar de vraag of buiten spelen goed is voor kinderen, dierproeven gedaan mogen worden. Er is al consensus over het feit dat buiten spelen goed is voor de ontwikkeling van kinderen. De kans dat dit onderzoek in ratten er toe leidt dat men de conclusie trekt dat het voor de ontwikkeling van kinderen niet uitmaakt en dat kinderen dus net zo goed binnen gehouden kunnen worden, lijkt wel erg klein. Dit onderzoek richt zich echter op de fundamentele vraag welk effect risicovol spel op de ontwikkeling van de mPFC heeft. Het vernieuwende aan dit onderzoek is daarnaast gelegen in het gebruik van DREADD-technologie en calcium imaging voor dat doel. De DEC is dan ook van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het neurobiologische- en gedragsonderzoekveld en de behoeften vanuit de beleidsmakers, de maatschappij en de geestelijke gezondheidszorg.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, kinderen/jongeren, beleidsmakers, onderzoekers/consortium en maatschappij. De proefdieren hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van de experimenten, de operatie en vroegtijdige dood. Volgens de onderzoeker spelen niet alleen kinderen te weinig maar ook laboratorium- en huisdieren. Een andere vorm van huisvesting met meer verrijking en meer mogelijkheden voor risicovol (sociaal) spel kan mogelijk het welzijn en de veerkracht van deze dieren ook vergroten, waardoor bijvoorbeeld de betrouwbaarheid van resultaten van dierproeven toe zou kunnen nemen. De resultaten van dit onderzoek kunnen hiermee van belang zijn voor dier en mens. De onderzoekers en het consortium hebben veel belang bij de resultaten uit dit onderzoek. waarmee de consequenties van speldeprivatie op de ontwikkeling van de hersenen en op gedrag wetenschappelijk bewezen kunnen worden. De samenwerkingspartners in het consortium vergroten daarbij de kans op vervolgonderzoek en kennisoverdracht en daardoor op de transleerbaarheid naar de maatschappij. Kinderen en jongeren, en uiteindelijk volwassenen en de maatschappij, hebben veel belang bij de ontwikkeling van hun veerkracht en een goede mentale gezondheid. Door dit onderzoek wordt hier meer inzicht in verkregen.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De opzet van het experiment t.a.v. de ervaring met risicovol spel in experiment 1.1 en experiment 1.2 is vrijwel identiek opgezet maar bij experiment 1.2 wordt direct gestart met STA- en BITA testen en bij experiment 1.1 starten de gedragstesten pas in een latere fase. De DEC ziet in dat dezelfde experimenten worden uitgevoerd waarbij vanaf het begin gedragstesten (STA en BITA) worden uitgevoerd om na te gaan hoe zich dat ontwikkeld met het spelgedrag en de leeftijd. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (zie ook C1).

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Een deel van de dieren wordt tijdelijk afgezonderd door middel van een perspex tussenwand in de kooi om onderscheid te kunnen maken tussen sociaal- en risicovol spel. Visuele, auditieve en olfactorisch interactie blijft echter mogelijk. Ook na de operatie (bijlage 2) verblijven de dieren kort solitair om te herstellen. Vanaf de 42<sup>e</sup> dag verblijven alle ratten in paren. Gezien de doelstelling van het project ziet de DEC de noodzaak om een deel van de ratten op deze wijze tijdelijk individueel te huisvesten, met mogelijkheid tot andere vormen van interactie.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is met 'matig' realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt veroorzaakt door de (vermijdbare) lichte elektrische voetschokken bij de gedragstaken, de blootstelling aan herhaaldelijke stress, de tijdelijke solitaire huisvesting (zie C10), de bloedafnames en de kortdurende gedragstesten en daarnaast in bijlage 2 voor een deel van de dieren (stereotactische) injecties van probes en chemische

modulatoren en implantatie van optische fibers in de hersenen. Voor de proeven in bijlage 1 wordt geen pijn voor de dieren verwacht. In verband met de operatie (bijlage 2) wordt injectie-anesthesie en, zowel pre- als postoperatief, pijnstilling toegediend.

12. De integriteit van de dieren wordt gedragsmatig aangetast door de dagelijkse training in de cognitieve taken, de gedragstaken en het niet onbeperkt (samen) kunnen spelen. Daar staat in dit geval tegenover dat een deel van de dieren, meer dan gewone laboratoriumdieren, een verrijkte omgeving met mogelijkheden voor risicovol spel en sociale interactie krijgen aangeboden. Per saldo is er dus vooral sprake van een aantasting van de integriteit bij de controledieren. De interventie kan juist als positief worden beschouwd. Voor een deel van de dieren wordt de integriteit ook fysiek aangetast door de operatie onder verdoving waarbij instrumentatie wordt aangebracht en de vroegtijdige dood.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt (bijlage 1 <0.1% en bijlage 2 <4%) is goed ingeschat. De DEC concludeert op basis hiervan dat er voor de proeven uit bijlage 1 geen experiment gerelateerde humane eindpunten te verwachten zijn. De criteria voor de humane eindpunten in verband met uitval door de operatie (bijlage 2) zijn duidelijk beschreven.

### 3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn zoals, computersimulaties of volledig humane studies om de complexe wisselwerking tussen risicovol spel, gedrag en hersenontwikkeling te bestuderen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk wordt gebruik gemaakt van een within-subjects design.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De ontwikkelde kooi met een unieke hoogte en wiebelende trappen is door de risicospelelementen niet alleen een onderzoekstool voor risky play maar ook een verrijking voor de ratten. Het voornaamste verschil is, naast het gebruik van hoogte en risicovolle materialen, de twee-uur durende speeltijd buiten de thuishooi en de timing van het spelaanbod. De DEC vindt dit onderscheid essentieel in verband met het belang van de studie en de onderzoeker heeft het verschil voldoende toegelicht.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. De studie start met mannelijke dieren. Indien effect aangetoond wordt, dan is een vervolg bij vrouwelijke dieren mogelijk. Voorlopige resultaten van recent onderzoek wijzen namelijk uit dat er genderverschillen zijn in de effecten van spel(deprivatie) op de hersenontwikkeling en dat deze effecten het grootst zijn in mannen. De DEC acht het in dit specifieke geval, waarbij het gaat over de vraag wat er nodig is voor de ontwikkeling van kinderen (dus ook meisjes) tot mentaal stabiele, weerbare volwassenen, van groot belang dat het onderzoek uiteindelijk ook in vrouwelijke dieren wordt uitgevoerd. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met, in eerste instantie, alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren in bijlage 1 (864 ratten) worden niet gedood in het kader van het project. De dieren in bijlage 2 (952 ratten) worden wel gedood in verband met de verificatie van de virusinfectie locatie en de post-mortem metingen. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is slechts deels van toepassing omdat de dieren uit bijlage 2 gedood worden in het kader van het experiment. De DEC heeft de onderzoeker gevraagd naar de mogelijkheden voor het bewaren en hergebruiken van de hersenen in een later stadium om eventuele aanvullende vragen te beantwoorden. De onderzoeker heeft voldoende toegelicht dat er vooralsnog geen financiële middelen zijn en dat de ervaring leert dat als er geen specifiek doel is, er ook zelden wat mee gedaan wordt. De dieren uit bijlage 1 zullen worden aangeboden voor hergebruik aan andere wetenschappers of voor educatieve doeleinden (ongeveer 60%). Als dat niet mogelijk is, worden deze dieren ter adoptie of via ATEX als orgaandonor aangeboden (ongeveer 40%).

*NTS*

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

#### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk onderzoeken hoe risicovol spel (of afwezigheid van spel) op jonge leeftijd bijdraagt aan de ontwikkeling van hersenen en gedrag, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de, in totaal 1816, gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief door gedragsexperimenten al dan niet gepaard gaande met stressvolle situaties, en pijnlijke prikkels, ingrepen in de hersenen, en voor een deel van de dieren sociale isolatie. Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project er toe bijdragen dat er wetenschappelijk bewijs geleverd wordt en er meer inzicht wordt verworven in de invloed

van spelen tijdens de jeugd op de veerkracht van mensen. Hierdoor kunnen preventiestrategieën worden ontwikkeld om stressbestendigheid al op jonge leeftijd te vergroten en risico's op mentale gezondheidsproblemen ook op latere leeftijd te verlagen. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van (jonge) proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Voor de individuele onderzoeker of consortium kan het van belang kan om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat onderzoek naar de invloed van risicovol spelgedrag op de ontwikkeling van de cortex en gedrag later in het leven een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. 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 er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD10800202216665

**Bijlagen**

2

Datum 23 december 2022

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 december 2022. Het gaat om uw project "PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202216665. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

**Datum:**

23 december 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216665

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



### Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: Dier in Wetenschap en Maatschappij, Population Health Sciences  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

### Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Universitair Docent  
Afdeling: Translational Neuroscience, UMCU  
E-mailadres: [REDACTED]

### Over uw aanvraag

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

### Over uw project

Geplande startdatum: 1 februari 2023  
Geplande einddatum: 31 januari 2028  
Titel project: PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control  
Titel niet-technische samenvatting: Risicovol spelen voor weerbaarheid en cognitieve controle  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.757,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

 Projectvoorstel Beschrijving Dierproeven Niet-technische samenvatting**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

20 december 2022



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD10800202216665  
**Bijlagen**  
2

Datum 23 december 2022  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 23 december 2022  
Vervaldatum: 22 januari 2023  
Factuurnummer: 2216665  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202216665	€ 1.757,00

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

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**To:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; CvB postmap \(UBD BS\)](#)  
**Cc:** [dec-utrecht@umcutrecht.nl](mailto:dec-utrecht@umcutrecht.nl)  
**Subject:** Aanhouden AVD10800202216665  
**Date:** maandag 6 februari 2023 11:17:25

---

Geachte [REDACTED]

Op 23-12-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control" met aanvraagnummer AVD10800202216665. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

### **Niet technische samenvatting**

- Onder expected impacts/adverse effects is te lezen "We verwachten vrijwel geen impact van de dierproeven op de gezondheid van de dieren." Aangezien het gaat om proeven met matig ongerief waarbij een deel van de dieren ook een operatie ondergaat en/of wordt gedood is de CCD van inschatting dat deze zin niet klopt. Kunt u dit toelichten of de zin verwijderen?

- De NTS is nu nog in het Word format. Kunt u een nieuwe versie direct op het vanuit de EU verplicht gestelde Excel format indienen?

### **Onduidelijkheden**

- In het projectvoorstel onder belanghebbenden (3.3.2) benoemt u niet de belangen van de proefdieren die in dit experiment gebruikt worden. Kunt u deze informatie nog toevoegen?

- In de bijlagen dierproeven is het niet voor elk experiment duidelijk hoe lang de experimenten maximaal duren, kunt u dit toelichten?

- In bijlage 1 geeft u onder D aan dat het niet te verwachten is dat de dieren pijn hebben, hoewel deze wel voetschokken ondergaan en er bloed wordt afgenomen. Kunt u toelichten waarom dit volgens u niet pijnlijk is of onder D "ja" invullen?

- In bijlage 2 voert u operaties uit. Zijn er nog specifieke humane eindpunten onder E te benoemen met betrekking tot herstel van de operatie?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal 17 februari worden besproken in de CCD vergadering. Antwoorden die voor deze datum worden ingediend zullen worden meegenomen in de bespreking van uw aanvraag.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



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

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.  
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Centrale Commissie Dierproeven

**Afzender**

[REDACTED]  
Departement Population Health Sciences  
Divisie Dier in Wetenschap en Maatschappij

**Bezoekadres**

Yalelaan 2  
3584 CM Utrecht

[REDACTED]

**Datum** 31-10-2022  
**Onderwerp** Aanhouden AVD10800202216665  
**Bijlagen** Aangepaste NTS, projectvoorstel, bijlage 1  
en bijlage 2

Geachte [REDACTED] geachte leden van de CCD,

Dank voor uw reactie op de door mij ingediende aanvraag voor een projectvergunning dierproeven getiteld "Age Matters" met aanvraagnummer AVD10800202216665. Ik wil hierbij graag reageren op de door u gestelde vragen en onduidelijkheden. De wijzigingen in de NTS, projectvoorstel en de bijlagen heb ik steeds geel gemarkeerd.

**Niet technische samenvatting**

- Onder expected impacts/adverse effects is te lezen "We verwachten vrijwel geen impact van de dierproeven op de gezondheid van de dieren." Aangezien het gaat om proeven met matig ongerief waarbij een deel van de dieren ook een operatie ondergaat en/of wordt gedood is de CCD van inschatting dat deze zin niet klopt. Kunt u dit toelichten of de zin verwijderen?

*Dit is inderdaad niet juist, deze zin is verwijderd.*

- De NTS is nu nog in het Word format. Kunt u een nieuwe versie direct op het vanuit de EU verplicht gestelde Excel format indienen?

*De NTS is nu in het verplichte Excel format ingediend.*

**Projectvoorstel en bijlagen**

- In het projectvoorstel onder belanghebbenden (3.3.2) benoemt u niet de belangen van de proefdieren die in dit experiment gebruikt worden. Kunt u deze informatie nog toevoegen?

*Zeker, ik heb de laatste alinea 3.3.2. uitgebreid met de volgende zinnen om het belang van de proefdieren in de experimenten in deze studie ook te benoemen: "Tot slot zijn ook de proefdieren belanghebbenden in dit project. De experimenten veroorzaken ongerief voor de dieren, en daarom hebben zij een negatief belang in dit project."*



- In de bijlagen dierproeven is het niet voor elk experiment duidelijk hoe lang de experimenten maximaal duren, kunt u dit toelichten?

*Ik heb nu in de bijlagen onder bij de beschrijving van de beoogde behandeling van de dieren aangegeven hoe lang de experimenten maximaal duren.*

- In bijlage 1 geeft u onder D aan dat het niet te verwachten is dat de dieren pijn hebben, hoewel deze wel voetschokken ondergaan en er bloed wordt afgenomen. Kunt u toelichten waarom dit volgens u niet pijnlijk is of onder D "ja" invullen?

*De voetschokken die we gebruiken zijn zeer mild (hooguit 0,45 mA). Deze schokken veroorzaken geen pijn, maar eerder een onprettig gevoel aan de poten. Dit hebben we ook zo benoemd onder F.*

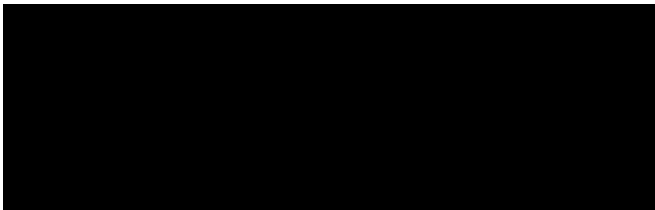
*Voor de bloedafnames kunnen we niet uitsluiten dat bloedafname pijn kan veroorzaken, al gebruiken we uiteraard methoden die zo min mogelijk ongerief voor de dieren veroorzaken (bijv. tail incision). Onder D heb ik nu "ja" ingevuld en ik heb toegelicht dat er geen pijnstilling wordt gegeven omdat "De pijn die mogelijk door de handelingen (systemische injectie, bloedafname) wordt veroorzaakt zodanig gering en kortdurend is dat het ongerief als gevolg van het toedienen van een pijnstillertje even hoog of hoger is dan de pijnprikkel van de handeling zelf."*

- In bijlage 2 voert u operaties uit. Zijn er nog specifieke humane eindpunten onder E te benoemen met betrekking tot herstel van de operatie?

*Na herstel van de operatie letten we (ook) met name op gewicht, daarvoor worden de dieren uiteraard post-operatief met een hogere frequentie gemonitord, motorisch afwijkend gedrag en lethargie.*

*Daarnaast geldt voor de operatie experimenten waarbij optische vezels geïmplanteerd worden dat zodra een kapje - die de optische vezel op zijn plaats moet houden op de schedel - loslaat van de schedel, het experimentele eindpunt niet meer bereikt kan worden. In dat geval is het humane eindpunt bereikt. Deze extra informatie is nu toegevoegd aan E in bijlage 2.*

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD10800202216665

**Bijlagen**

3

Datum 6 maart 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte prof. Pijpers,

Op 23 december 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control" met aanvraagnummer AVD10800202216665. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 6 maart 2023 tot en met 31 januari 2028.

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

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 januari 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 6 februari 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de belangen van de proefdieren, de maximale duur van de experimenten, het aangeven van pijn bij de proefdieren, de humane eindpunten en enkele teksten in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### **Datum:**

6 maart 2023

### **Aanvraagnummer:**

AVD10800202216665

### **Overwegingen**

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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

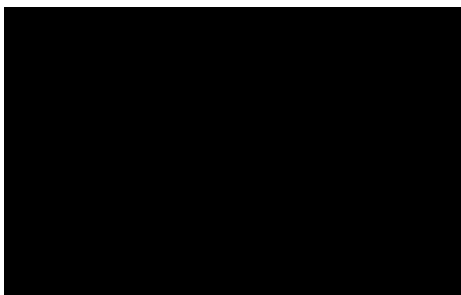
**Datum:**

6 maart 2023

**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216665

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Universiteit Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 maart 2023 tot en met 31 januari 2028, voor het project "PlayRisC - Playing for Resilience and Cognitive Control" met aanvraagnummer AVD10800202216665, na advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 23 december 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 10 februari 2023;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. Invloed van spel ervaring op cognitieve controle, al dan niet in relatie tot stress, zoals ontvangen op 10 februari 2023;
    - 3.4.3.2. Neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress, zoals ontvangen op 10 februari 2023;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 10 februari 2023;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 januari 2023
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 10 februari 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. Invloed van spel ervaring op cognitieve controle, al dan niet in relatie tot stress</b>			
	Ratten (Rattus norvegicus) / Lister Hooded	864	100,0% Matig
<b>3.4.3.2. Neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan cognitieve controle in relatie tot spel en stress</b>			
	Ratten (Rattus norvegicus) / Lister Hooded	952	100,0% Matig

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

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

**Aanvraagnummer:** AVD10800202216665

- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216665

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD10800202216665

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.

### **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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.