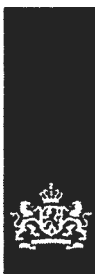


Inventaris Wob-verzoek W15-11									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS 2015126</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Flow chart				x		x	x	
10	Overzicht aantallen				x		x	x	
11	DEC-advies				x		x	x	
12	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
13	Mail indienen 15-7-2015				x		x	x	
14	Mail aanvraag 20-7-2015				x		x	x	
15	Mail vervolgbrief 31-7-2015				x		x	x	
16	Vervolgbrief				x		x	x	
17	Acceptatiebrief				x		x	x	
18	Mail aanvullende informatie 10-8-2015				x		x	x	
19	Brief aanvullende informatie				x		x	x	
20	Beschikking				x		x	x	
21	Vergunning			x					
22	Mail beschikking 13-8-2015				x		x	x	
23	Advies CCD		x						x

16 JULI 2015



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 80101 Nederlands Herseninstituut-KNAW <i>1126</i> <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>KNAW</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>5 4 6 6 7 0 8 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	KNAW	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9									
Naam instelling of organisatie	KNAW																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td></td></tr><tr><td>Postbus</td><td>Postbus 19121</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1000GC Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL33DEUT0546900054</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Nederlands Herseninstituut</td></tr></table>	Straat en huisnummer		Postbus	Postbus 19121	Postcode en plaats	1000GC Amsterdam	IBAN	NL33DEUT0546900054	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Nederlands Herseninstituut					
Straat en huisnummer																	
Postbus	Postbus 19121																
Postcode en plaats	1000GC Amsterdam																
IBAN	NL33DEUT0546900054																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Nederlands Herseninstituut																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Group Leader</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Group Leader		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Group Leader																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 \_ 0 8 \_ 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 \_ 0 8 \_ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and ...
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Compulsief gedrag en zijn componenten: neurobiologische metingen en hersenstimulatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-KNAW
- Postadres ██████████ Amsterdam
- E-mailadres ██████████

## 4 Betaalgegevens


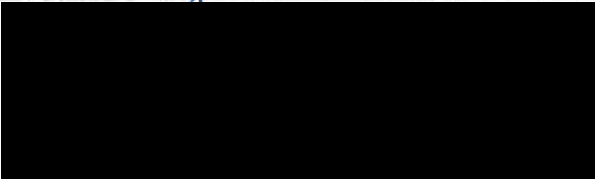
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel  
 Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging  
 Appendixen 5 maal; flow chart

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	Directeur Instituten KNAW
Plaats	Amsterdam
Datum	10 - 07 - 2015
Handtekening	







## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

The term compulsivity is used to describe dysfunctional behavior in various neuro-psychiatric disorders such as substance and behavioral addictions, obsessive-compulsive disorder (OCD), impulse-control disorders, and eating disorders. The presence of compulsive tendencies in all of these disorders makes a

strong case for a shared underlying mechanism. Compulsive behavior is characterized by the feeling that one 'has to' perform a specific act as a result of an urge (e.g., to avoid a negative emotional state). At the same time, patients are aware of the conflict between the performed act and maintaining their quality of life. Thus, compulsivity produces behavior that we perform against our will and despite its negative consequences. Examples of such consequences are the OCD patient unable to hold a job because he/she spends almost every waking hour cleaning his/her house or the addict that isolates him/her-self from friends and family because he/she continues to relapse to drug abuse despite the best intentions not to. It has been suggested that compulsivity is a so-called 'endophenotype', a behavioral pattern or response mode that is preserved across different disorders. In order to better characterize this concept, its composition can be described as separate components: 1) persistence of performance, 2) elicitation of undesirable consequences, 3) escalation of symptoms over time, 4) aggravation by stress and anxiety, 5) exaggerated habit formation, 6) response inflexibility, and 7) loss of voluntary control. Whereas 1), 2), 3) and 7) are components that cannot be studied separately from the compulsive phenotype itself, 4), 5) and 6) may be endophenotypes that exist in the normal population and lower the threshold for compulsive behavior to develop. **For a better understanding of disorders featuring compulsivity, both the obvious pathological phenotype (compulsivity) itself, as well as these individual components have to be investigated.**

One prominent theory of compulsive behavior proposes a dysfunction or imbalance between competing brain systems: the system that controls more purposeful, goal-directed behavior and the system that supports automatic, habitual behavior (Everitt and Robbins, 2005; Dalley et al, 2011). Goal-directed behavior is based on knowledge of the causal relationship between an action and its consequences (outcomes), and is only performed when those consequences are desired. In contrast, habitual behavior consists of actions that are automatically triggered by environmental stimuli regardless of the current desirability of the consequences, insensitive to its outcomes. These stimulus-response associations that mediate habitual behavior have been strengthened either by reward (positive reinforcement; e.g., drug abuse that improves the user's mood) or by the omission of an aversive event (negative reinforcement; e.g., house cleaning in order to avoid feeling anxious). Habitual behavior can arise under many conditions, the most common one of which is extensive behavioral repetition (Dickinson et al, 1985). However, habits can also arise from failures in goal-directed control and exposure to stress, which can lead to habitual behavior even without extensive behavioral repetition, underlining the competing hierarchy between these behavioral control systems. Therefore, **both systems, habit and goal-directed, can contribute to the likelihood that a habit will be formed in a given situation.**

In patients suffering from psychiatric disorders with compulsivity, such as OCD and drug addiction, an increased tendency towards forming habits has been reported (i.e., in these individuals habits form faster and the habit system dominates their behavior; Voon et al, 2014; Gillan et al, 2015), which has been observed regardless of whether such habits work toward gaining reward or toward avoiding punishment. Stress and anxiety, states present in many disorders, may contribute to this enhanced habit formation (Schwabe et al, 2011). Moreover, it has been suggested that in such a situation habits can become excessive and progressively compulsive as a result of disturbances of brain systems controlling behavior (e.g., a drug-use habit escalates into compulsive drug addiction or cleanliness escalates into obsessive-compulsive cleaning (escalation)). However, how far aberrant habit formation contributes to compulsivity is currently still unclear. Also unclear is whether hypo-function of the goal-directed or hyper-function of the habitual system drives the exaggerated tendency to display habits, and the extent of stress and anxiety as driving forces. Importantly, **despite the habit-hypothesis being the most prominent contemporary theory, dysfunction of any or all of the other individual components mentioned above** (e.g., response inflexibility or insensitivity to negative consequences etc.) **are alternative sources of compulsive behavior** that may or may not interact with habits to produce pathology. Thus, for a better understanding of disorders featuring compulsivity and in order to answer the following questions, both the compulsive behavior itself ('models') as well as all individual components potentially contributing to compulsivity and their interaction have to be investigated. How are these components related to each other? Are habit-prone individuals more susceptible to develop compulsivity? Do habits escalate into compulsivity? Is compulsivity an "endophenotype" that is linked to genetic variations in neurobiological processes? Or are these patients just unable to flexibly change or lose voluntary control of their behavior? And importantly: What are the underlying neurobiological mechanisms of these processes?

The basal ganglia, a subcortical brain system found in all mammals, are thought to serve the purpose of selecting a behavior strategy appropriate for a given situation through interaction with cortical regions that participate in higher cognitive processes and sensorimotor performance. The main input nucleus of

the basal ganglia, the striatum, receives inputs from different functional units of the cortex, and the neurotransmitter dopamine acts as a regulator of cortical information flow through the striatum. Several regions of the cortex and the striatum are thought to be involved in controlling goal-directed and habitual behavior. For example, the medial striatum and the medial prefrontal cortex (mPFC) have been shown to subserve learning involving goal-directed behavior. In contrast, the dorsolateral striatum (DLS) and the infralimbic cortex (IFC) are necessary for the formation of habits. Dysfunction of these systems is indicated in several compulsive disorders: 1) Drug addiction and OCD are characterized by altered activity of the dopamine system, which could manifest as a tendency for natural rewards to lose their value. 2) Dysfunctions of the striatum and mPFC are present in addiction, OCD, obesity, and bulimia nervosa (Robbins et al, 2011). In summary, **different 'cortico-striatal loops' are putatively associated with aspects of compulsivity** but it is still unclear which specific brain systems mediate this development and how they interact.

Although a variety of behavioral and pharmacological treatments for compulsive disorders are available, in many cases such therapy is not successful. Thus, it is of great importance to identify new targets and to develop more effective therapies. A promising avenue opened up when it became clear that **deep-brain stimulation (DBS) is effective in a number of psychiatric disorders**. Although it is not exactly clear how this high-frequency electrical stimulation exerts its effects, recent data suggests that it may interrupt the pathological activity of a cortico-striatal loop, allowing an attentional shift away from excessive processing of disease-related, habit/compulsivity-eliciting stimuli and restoration of goal-directed behavior. Thus, stimulation of a relatively small target area may potentially lead to rapid, broad, and clinically relevant changes in brain network function. However, as said, our understanding of the mechanisms of action of how DBS reduces compulsivity is still limited. What is the neurobiological basis of the therapeutic effects of high-frequency stimulation in this spectrum of compulsive psychiatric disorders? What are the best and safest brain targets for changing pathological behavior in OCD, addiction, and eating disorders? Thus, another long-term goal of our research line is to contribute to answering such questions. As these disorders are characterized by profound behavioral alterations due to disturbances of affect, motivation and cognition, our research proposed in this application is focused on neurobiological substrates of affect, motivation and cognition in general as well as specific key features (components; see above) of these disorders, such as for example the nature of inflexible behavior.

**The main objective of the project is to provide a better understanding of the neurobiology of compulsive behavior.** In order to do so, compulsive behavior itself AND a variety of motivated behaviors thought to constitute or contribute to compulsivity (components) will be studied in rodents while neural measurements and interventions are performed.

**How to study compulsive behavior in rodents:** It is difficult to model all aspects of a psychiatric (human) disorder in animals, but it is feasible to study certain aspects of such psychiatric disorders, focusing on distinct neurobehavioral domains. Human compulsive behavior has many aspects and it is still not clear whether it is a "single endophenotype" with a single underlying mechanism, or whether different forms of compulsivity with different mechanisms exist. Thus, to properly model compulsivity in animals, the use of several models is necessary. Animal models for compulsive disorders can for example model the progression from recreational to compulsive consumption of drugs of abuse or high-fat/high-sugar foods. Furthermore, the development of excessive repetitive performance of purposeless actions, akin to OCD, can for example be studied in the Sapap3-mutant mouse model, which shows excessive grooming behavior associated with increased levels of anxiety (Welch et al, 2007). In a more recent model, mice develop increased grooming behavior after optogenetic stimulation of a corticostriatal brain circuit (Ahmari et al, 2013). Another, pharmacological paradigm allows the study of the development of compulsive licking and/or checking behavior in rats, following repeated administration of quinpirole, a dopamine receptor agonist (Eagle et al, 2014). Finally, compulsive drinking may develop in animals exposed to repetitive timed food presentation (schedule-induced polydipsia (Falk, 1961). Common read-outs of these compulsive behaviors are the registration of natural repetitive actions (grooming, licking). Additional tests may be used to probe the presence of perseverative, inflexible and/or habit-like behavior in operant tasks where an animal may obtain a reward or may avoid a punishment. A special form of this is the signal attenuation model, in which rats are tested in a condition of diminished response feedback (Joel, 2006). In this way, the relation between excessive repetition of natural behaviors likely to establish habits and the presence of compulsivity in more complex, acquired behaviors is studied (including for example cognitive flexibility). At the same time, these models are perfectly suited to study the underlying neuronal mechanisms and test novel treatment strategies. In order to answer the question whether compulsivity is a single 'endophenotype', a behavioral response mode that is preserved across environmental contexts and disorders, it is necessary to use a number of different animal models of

compulsivity. Verification of whether this trait is stable across different behavioral tests and whether the same underlying brain mechanisms can be identified in these tests, will enable the exploration of this question. We hypothesize that there is indeed a single compulsivity trait.

Our group has gathered extensive experience in using various models of compulsive behavior, most notably with compulsive self-administration of cocaine in rats, compulsive grooming in Sapap3-mutant mice, compulsive checking in quinpirole-treated rats, and compulsive responding following "signal attenuation" in mice. In our lab, operant boxes, various mazes, and other test arenas are successfully employed to analyze spontaneous and learned behavior, including habit formation, reversal learning and other tests of cognitive flexibility. These rodent models are routinely combined with *intervention techniques*, such as optogenetic intervention, DBS, intracerebral and systemic drug administration, and *measurements of brain activity*, such as neurochemical and neurophysiological methods including microdialysis, fast-scan cyclic voltammetry, and electrophysiology. Our results showed for example, that dopamine release in the brain is different between rats progressing to compulsive cocaine self-administration and rats that do not. We also found that differences in dopamine signaling in the striatum are predictive for the ability to rapidly learn a reversal of response-reward relations. Furthermore, neuronal activity measured in the striatum and connected cortical regions was predictive of compulsive behavior after repeated quinpirole administration. Based on this experience, we feel that we can take the next step in our research and try to answer the question which common neurobiological mechanisms underlie the development, escalation, and persistence of different forms of compulsive behavior and which brain stimulation targets may contribute to remission of compulsive behavior. To our knowledge, this approach is unique – worldwide, most groups work on a single model of compulsivity, most often substance addiction. Moreover, attempts to reverse compulsive behavior using DBS are still scarce and, if performed, are not followed up by studies of the underlying mechanisms. We are among the few groups worldwide where direct and extensive interactions between animal and clinical scientists is practiced.

Ahmari et al (2013) Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science*, 340(6137), 1234-1239.

Dalley et al (2011) Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron* 69, 680-694.

Dickinson (1985) Actions and habits: The development of behavioral autonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308:67-78.

Eagle et al (2014) The dopamine D2/D3 agonist quinpirole increases checking-like behavior: a novel possible model of OCD. *Behav Brain Res.* 264:207-29.

Everitt and Robbins (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1481-1489.

Falk (1961) Production of polydipsia in normal rats by an intermittent food schedule. *Science* 133, 195-196.

Gillan et al (2015) Functional Neuroimaging of Avoidance Habits in Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry* 172:3.

Marsh et al (2009) Deficient activity in the neural systems that mediate self-regulatory control in bulimia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 51-63.

Robbins (2012) Neurocognitive endophenotypes of impulsivity and compulsivity: towards dimensional psychiatry. *Trends in Cognitive Sciences*, Vol.16, No.1.

Schwabe et al (2011) Stress, habits and drug addiction: a psychoneuroendocrinological perspective. *Exp. Clin. Psychopharm.* 19, 53-63.

Voon et al (2014) Disorders of compulsivity: a common bias towards learning habits. *Mol Psychiatry* 20(3):345-52.

Welch et al (2007) Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviors in Sapap3-mutant mice. *Nature* Aug 23;448 (7156):894-900.

### 3.2 Purpose

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

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

As explained above, compulsive behavior is believed to be a central common denominator to several neuro-psychiatric disorders such as addictions, obsessive-compulsive disorder (OCD), and eating disorders. Compulsive behavior is probably constituted by a number of individual components, such as behavioral inflexibility, and it is aggravated by stress and anxiety, whereby it is hypothesized that

aberrant habit formation is crucial for its development. The main objective of the project is to provide a better understanding of the neurobiology of compulsive behavior. In order to do so, compulsive behavior itself and a variety of its presumed components will be studied while neural measurements and interventions are performed.

**The general research questions addressed by this approach are:**

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

**These objectives are achievable because...**

- 1) ... the lab has powerful research tools at its disposal (e.g., opto- and chemogenetics, electrophysiological and electrochemical detection of brain activity, animal models for compulsive disorders),
- 2) ... the lab is situated in an excellent research environment with state-of-the-art facilities and close proximity to outstanding scientists at [REDACTED],
- 3) ... the lab has outstanding national and international collaborators (e.g., [REDACTED]),
- 3) ... the proposed strategy is heavily grounded on our laboratory's expertise,
- 4) ... technical skills necessary are almost all already in place,
- 5) ... we have a close collaboration with [REDACTED] warranting proximity to the clinical condition
- 6) ... we have a proven track record of successfully conducting and publishing comparable research in highly respectable scientific journals in the past (e.g., [REDACTED]).
- 7) ... we have a proven track record of successful grant applications (e.g., [REDACTED]).

References:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

**3.3 Relevance**

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

**Scientific relevance**

*The identification, characterization, and understanding of brain pathways mediating a progression from learning a new behavior to its automatic execution and in some cases to pathological compulsive execution, will have great impact on several fields of neuroscience. Such pathways, although assumed for decades, have yet to be verified. All fields that focus on subjects related to the translation of motivation into behavioral action will be affected, including research either restricted to motor systems only or fields exclusively focused on motivation and emotion. Furthermore, this application is aimed at further elucidating a long-standing question in the field - if and how habits, compulsions, behavioral flexibility, stress, anxiety and impulsivity are related to each other. Thus, discovery of such brain pathways and their functional relevance will potentially offer fundamental insights into how we/our brains control behavior.*

**Social relevance**

Compulsivity research is expected to lead to novel insights that may tie psychiatric diseases together that are now often studied and treated separately, and paving the way to define and treat conditions that

are common to obsessive-compulsive spectrum disorders, substance addiction and eating disorders. *Knowledge and understanding of the neurobiological mechanisms of conditions such as exaggerated habitual responding, inflexible behavior or high sensitivity to stress will lead to a better understanding and hopefully an improved acceptance of psychiatric patients in our society.* This knowledge will also be applied in clinical psychiatric research to improve and extend treatment options for individual patients and for the society as a whole. DBS is one of these treatment options, as its application has been successfully extended from neurological disorders to mental health conditions, a relatively new field that still needs improvement. Thus, our results could be of great benefit for psychiatric conditions by identifying new target brain regions for DBS electrode placement to improve therapeutic efficiency (e.g., specific anatomical circuitry underlying maladaptive habits). The lab's close ties with the [REDACTED] favors the realization of such future DBS applications. For example, if we are able to identify a specific brain pathway that is crucial for rendering inflexible behavior flexible, DBS electrodes could be directed at that region in OCD patients, addicts, and other patients in a clinical trial. Furthermore, stimulation parameters could be optimized in animal models of compulsive disorders. Together, these approaches may improve the quality of life of many different patient populations. Finally, technological advances such as DBS electrodes that can record brain activity in addition to provide stimulation may lead to closed loop, feedback-based appliances, that cannot be developed and applied without thorough testing in experimental animals.

### **Translational relevance**

Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public. We will take advantage of the [REDACTED], operated by professional journalists. We have previously utilized these services for one of my publications in [REDACTED] in 2014 in order to engage the general public through Dutch media nationwide (e.g., [REDACTED]).

[REDACTED]). Such outreach is of importance to raise awareness for the problems of patient suffering from compulsivity, but also to support patients by explaining the biological foundation of their troubles to them. Although the research proposed in this application is fundamental in nature, the knowledge gained from these studies has great potential for translational utilization. An important contributing factor to enable this is the embedding of my [REDACTED] research group in a larger clinical research team at the [REDACTED], where we are involved in weekly meetings. These close ties provide optimal conditions to set up translational, multidisciplinary research.

---

## **3.4 Research strategy**

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

We are interested in how the brain controls behavior. The ultimate, long-term goal is to better understand how processes mediating learning, emotion, and motivation are affected in pathological conditions such as compulsive behavioral disorders and to invigorate the development of new treatment strategies and optimize existing therapies. We have strong ties with clinical researchers studying compulsive behavior, its neurobiological characteristics and its therapies in patients (in particular DBS). To contribute to the understanding of such pathological processes, we use rodent models of compulsive behavior. By choosing a variety of models we aim to discover the shared mechanism in the various presentations of compulsive behavior. To fulfil this aim, we chose several models that reflect sufficiently different phenotypical presentations: Pharmacological (e.g. repeated administration of the dopamine agonist quinpirole leads to compulsive checking and loss of flexible responding), genetic (e.g. Sapap3-mutant mice show increased anxiety and develop compulsive grooming) and addiction models (e.g. extended exposure to self-administration of cocaine leads to compulsive seeking and taking of the drug). Together, they model compulsive behavior from simple repetitive actions (grooming; reminiscent of autism or impulse disorders) to complex behavior (checking and drug seeking; reminiscent of obsessions and substance addiction). The use of mice in addition to rats is based on the fact that transgenic mice such as the Sapap3-mutant mice are up to now the only model with spontaneous compulsive behavior, where no additional pharmacological treatment or behavioral training is required. These are also the models that we have been using for 2-6 years now and, therefore, form our first tier of models, but these models may be extended or replaced by other pharmacological, behavioral and addiction models, that e.g. show a less variable presentation.

These models will be used to study the development of compulsivity, the individual variation of the phenotypes and the behavioral nature of the dysregulation in the first part of the project (**3.4.4.1 Establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its**

**components**; see flow chart – the main read-out is behavior). Compulsivity in patients is regarded as behavior performed despite negative consequences. The animal models should incorporate similar negative consequences (e.g. the skin lesions developing in Sapap3-mutant mice as a result of excessive grooming or the foot shocks cocaine-addicted animals are prepared to accept to obtain their drug reward). Furthermore, we are interested in the presence of the various components of compulsivity, such as increased habit formation, diminished cognitive flexibility, and anxiety and aggravation by stress. These components are important as they may represent “building blocks” of a general compulsive phenotype. One of the outstanding questions is whether they are present before compulsivity develops, or whether they may be consequences of that. Our hypothesis is that they are present as predisposing factors that lower the threshold for the development of compulsive activities. In parallel experiments, our clinical collaborators also study the relation between components such as habit formation and overall OCD symptoms. Thus, similar approaches allow translational comparisons. Together, in 3.4.4.1 we will improve behavioral tests but also use these tests to answer questions such as how does compulsive behavior develop and what is the relation with separate behavioral components?

In the subsequent parts of the project, we will focus on the study of the neurobiological mechanisms underlying the behavior (**3.4.4.2 Identification of brain correlates of compulsive behavior and its components**; see flow chart). Here, both (1) normal function of brain circuits responsible for the production of functional behavior, as well as (2) the nature of dysregulation in the “diseased” state have to be investigated. We aim to do so by employing a variety of techniques to measure brain activity and neurotransmitter release in awake rodents. Our prime interest here is to characterize the functional status of the cortico-basal ganglia-thalamic circuits that support normal motivated behavior and are thought to be dysregulated in the case of compulsive behavior. These measurements will allow us to detect neurobiological correlates of compulsive actions (e.g., grooming bouts in transgenic mice; compulsive lever-pressing for drug-related cues in rats). Results will be discussed with our clinical colleagues and compared with the clinical results that are obtained using various measuring techniques.

In parallel, to discover causal relationships between brain activity and behavior, brain activity is manipulated (**3.4.4.3 Establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation**; see flow chart) using different interventions such as DBS, pharmacogenetics, optogenetics, lesions, and pharmacological treatments (the main read-out is behavior). The target position will be based on the knowledge we have of the functional circuits supporting the compulsivity and its components and in normal animals.

Finally, the interplay of neurobiological variables (e.g., neurotransmitters) and neuroanatomical pathways are investigated during behavior (**3.4.4.4 Establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation** – main read-out is the relation between behavior and neuronal activity) but also in the anesthetized animal or brain slices, where, in isolation, brain activity is easier to assess and brain stimulation is applied easier (**3.4.4.5 Identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation**; see flow chart – the main read-out is neuronal activity). Of these two possibilities, the combination with behavior may be considered the highest level of integration. These studies are restricted to the situation where an intervention has resulted in a promising behavioral effect (e.g. anticomulsive effect in one or more of the models) and information on the neurobiological mechanisms of action is wanted.

The experiments under anesthesia (terminal studies) may be applied to obtain information on circuit connections, selectivity of targeted interventions, etc. Thus, the functional status of the corticostriatal pathway in Sapap3-mutant mice may be studied by electrical or more selective optogenetic stimulation of prefrontal areas and electrophysiological recording or Ca-imaging of striatal activity; The choice for such experiments under anesthesia is also driven by the wish to limit discomfort and only use awake animals in experiments that involve behavior or measurements that are known to be fundamentally affected under anesthesia.

Choices and Go/NoGo decisions.

The choice for the first three animal models for compulsive behavior (first tier) is based on their different characteristics that will allow us to discover the shared mechanisms in the various presentations of compulsive behavior. Further model choices in the course of the project will depend on scientific, practical, and animal-welfare factors. The choice is always determined by the wish to have the best practical option to answer our main scientific questions, with the least discomfort for the animals. Once a



behavioral strategy is established and the desired behavior is reproducibly detected (3.4.4.1), brain activity during this behavior is assessed in another set of animals (measurement; 3.4.4.2) or interfered with in another set of animals (intervention; 3.4.4.3) in order to unravel the neurobiological underpinnings of this behavior (GO point). If we are not able to obtain reproducible and validated compulsive behavior (3.4.4.1) such neurobiological measurements (3.4.4.2) or interventions (3.4.4.3) will not be attempted (NOGO point). If we yield promising results, a combination of the two will be attempted (optional GO point; 3.4.4.4), otherwise not (NOGO point). Thus, in summary, we will only start using an animal model in 3.4.4.2 and 3.4.4.3 after this model has been implemented successfully under 3.4.4.1, and we will only start 3.4.4.4 following successful execution of 3.4.4.2 or 3.4.4.3. An additional approach is the combination of neurobiological measurements and interventions in the anesthetized animal or in brain slices (3.4.4.5). Here, circuits or targets that are of interest are directly studied without preceding behavioral studies. In case of a positive outcome, these targets may be used in the combined studies of 3.4.4.2 and 3.4.4.3, and may eventually be followed by 3.4.4.4.

Before we start our experiments we will write an application to the IvD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe in full detail the experimental design, discuss the number of animals in the experiments, describe human endpoints, alternatives, and the nature of discomfort. Experiments will only be started upon IvD approval.

---

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

#### **3.4.4.1 Establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its components**

Behavioral assays are carried out in standard operant boxes (e.g., levers that can be pressed by the animal to achieve an outcome), touch-screen boxes (touch screens instead of levers), open-field boxes (empty arenas for animals to explore), and mazes of different shapes (more complex arenas animals can explore and find rewards). In these rodent assays (1) models of compulsive behavior; and (2) components of compulsive behavior, among which habit formation, cognitive flexibility, the relation with fear and anxiety and the impact of stress or enrichment are assessed. Assays that will be employed will probe spontaneous behavior, reward-driven behavior, and also punishment-driven behavior. Depending on the model and the additional component(s) studied, the total testing time for individual animals will vary between 2 and 6 months, but transgenic animals spontaneously showing compulsive behavior may be followed for up to 1 year. Important additional (e.g. correlational) information is expected from testing animals in more than one behavioral assay, one of which is assessing the compulsive behavior. Thus, e.g. anxiety and reward-driven behavior may be characterized before an animal is made compulsive by repeated quinpirole administration; cognitive flexibility is tested in an animal before and/or after being trained to compulsively self-administer cocaine; a Sapap3-mutant mouse that shows compulsive grooming is studied in a habit-formation paradigm, etc.

The general organization is:

- A) to establish and validate animal *models* for compulsive behavior – in pilot experiments a satisfactory paradigm is selected for further studies.
- B) to characterize the tested population of animals (mice and rats) for individual differences to unravel biological mechanisms.
- C) to establish and validate behavioral methods to assess *components* of compulsive behavior – in pilots a satisfactory paradigm is selected.
- D) to characterize the compulsivity in relation to its behavioral components – based on the paradigms developed in C, experiments in which one of the components is tested in one of the models of compulsive behavior. All these experiments will also include the testing of general anxiety as a second component tested.

We will start in A) with 3 models (Sapap3-mutant, cocaine self-administration and quinpirole treatment) and characterize individual differences in B). We will start in C) with habit formation and combine that in D) with the three models.

Aspects of this section that will extend beyond pure behavioral testing are:

- a. Drug self-administration will require catheter implantation in order to apply intravenous drug injection.
- b. Tests to establish “true” compulsivity in rewarded behavior will involve testing behavior in combination

with foot shocks and acquired taste aversion.

c. Sapap3 mutant mice can develop a phenotype with constitutional discomfort. Close monitoring prevents development of skin lesions with more than moderate discomfort.

d. Impact of acute or chronic stress on behavior and well-being will be monitored by measurement of plasma levels of e.g. corticosterone.

#### **3.4.4.2 Identification of brain correlates of compulsive behavior and its components**

Once a behavioral strategy is established and the desired behavior is detected, brain activity during this behavior is measured in order to unravel the neurobiological underpinnings of this behavior. Thus, in these procedures behavioral tests described under 3.4.4.1 will be combined with a "neuro-measurement" technique. The techniques to measure brain activity in awake rodents in our lab are:

Measure-1) electrophysiology to assess neuronal firing and brain network activity

Measure-2) electrochemistry to assess fast neurotransmitter release (e.g., fast-scan cyclic voltammetry)

Measure-3) microdialysis to assess slow neurotransmitter release

Measure-4) calcium imaging to assess neuronal ensemble activity (virus injections prior to testing necessary to visualize calcium release)

Measure-5) functional magnetic resonance imaging (fMRI) to assess whole-brain activity

The general organization is:

A) to establish and validate the measurement techniques in animal *models* for compulsive behavior – a paradigm is selected (in 3.4.4.1).

B) to measure the neuronal activity parameter in the animal *models* –will deliver data of neuronal activity during compulsive behavior.

C) to establish and validate the measurement techniques when *components* of compulsive behavior are studied in animals showing compulsive behavior – in pilot experiments a satisfactory paradigm is selected.

D) to measure the neuronal activity parameter in the animal models while they are engaged in one of the *components* –will deliver data of neuronal activity during e.g. habit formation in compulsive animals.

Depending on the results with 3.4.4.1 we will start in A) with three models (e.g. a transgenic mouse, a rat pharmacological and a rat addiction model) and three measurement techniques (electrophysiology, fast-scan cyclic voltammetry and fMRI). Electrophysiology and voltammetry will be used in all three models, but fMRI will be restricted to the rat models. We will then perform formal measurements under B). We will start in C) adding the component that in 3.4.4.1 turned out to be the most interesting one – formal measurements are then carried out under D).

All of the above measuring techniques (3.4.4.2) will require intracranial (technical) implants mounted to the skull of the animals with screws and dental cement. Measure-1 through Measure-4 require tethering of the animals from their cement head caps (implants differ slightly depending on the technique) to commutators (connected with technical equipment) to allow animals to move freely during the behavioral assays. Measure-5 requires head re-straining because movement artefacts will otherwise prevent measurements. The use of behavioral tests in combination with Measure-5 is restricted and will mainly concern inducing a compulsive phenotype before measurements with fMRI.

#### **3.4.4.3 Establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation**

To discover causal relationships between brain activity and behavior, behavioral tests described under 3.4.4.1 will be combined with a "neuro-intervention" technique, which will often involve invasive procedures. The techniques to interfere with brain activity in awake rodents in our lab are:

Intervent-1) deep-brain stimulation (DBS; high-frequency electric stimulation of brain tissue via intracranially implanted micro-electrodes)

Intervent-2) pharmacogenetics (virus injections prior to testing necessary for expression of drug-sensitive receptors in specific cell populations and subsequent intervention by drug application)

Intervent-3) optogenetics (virus injections prior to testing necessary for expression of light-sensitive receptors in specific cell populations and subsequent intervention by light application)

Intervent-4) brain lesions (both permanent and transient inactivation of specific brain regions via intracranial injection of substances)

Intervent-5) pharmacological treatments (both systemic and intracranial application of neuro-active drugs)

The general organization is:

- A) to establish and validate the intervention techniques in animal *models* for compulsive behavior – a satisfactory paradigm is selected (in 3.4.4.1).
- B) to interfere with the neuronal activity in the animal *models* – will deliver behavioral data of intervention-induced alterations in compulsive behavior.
- C) to establish and validate the intervention techniques when *components* of compulsive behavior are studied in animal models of compulsive behavior – in pilot experiments the first steps are taken, until a satisfactory paradigm is obtained; that paradigm will be validated.
- D) to interfere with the neuronal activity in the animal models while they are engaged in one of the *components* – will deliver behavioral data of intervention-induced alterations in habit formation etc in compulsive animals.

Depending on the results with 3.4.4.1 and 2 we will start in A) with 3 models (e.g. a transgenic mouse, a rat pharmacological and a rat addiction model) and 3 intervention techniques (DBS, optogenetics, pharmacogenetics). We will then perform formal experiments under B). We will start in C) with the component that gave the most promising results in the previous studies and combine that with the three models.

Most of the above techniques (3.4.4.3) will require intracranial (technical) implants mounted to the skull of the animals with screws and dental cement and tethering of the animals from their cement head caps (implants differ slightly depending on the technique) to commutators (connected with technical equipment) to allow animals to move freely during the behavioral assays.

#### **3.4.4.4 Establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation**

Based on the results and/or the experience with behavioral and neurophysiological/neurochemical measurements, and with neural interventions, we will use combinations of one of the neuro-intervention with one of the neuro-measurement techniques described under 3.4.4.2 and 3.4.4.3 in ongoing behavior, as described under 3.4.4.1. Such combinations will allow the assessment of whether manipulated brain activity takes place, and whether it manifests time-locked to the ongoing behavior. When the results obtained in the measurement and/or intervention section that combined experiments are indicated, the general organization is:

- A. to establish and validate the combination of intervention and measurement techniques in animal models for compulsive behavior, either with or without engagement in one of the components – in pilot experiments a satisfactory paradigm is selected for further studies.
- B. to interfere with the neuronal activity in the animal models and measure the effect on neuronal activity – will deliver causal relations between intervention-induced alterations in behavior and neuronal activity.

#### **3.4.4.5 Identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation**

In a parallel approach, the interplay of neurobiological variables (e.g., neurotransmitters) and neuroanatomical pathways are investigated in the anesthetized animal, where, in the absence of movement, brain activity is easier to assess and brain stimulation is applied easier (no long-term implantation necessary). Questions that can be answered with this approach include: How do the basal ganglia propagate information (neuronal activity) between different functional subunits? Or how reactive are different subregions to neuronal input from the cortex or the midbrain (inputs activated with a stimulation technique (e.g., optogenetics) and output measured with a measuring technique (e.g., voltammetry). Thus, in anesthetized animals (short-term experiments → no survival surgery), we will combine the use of one of each of the under 3.4.4.2 and 3.4.4.3 described neuro-intervention and neuro-measurement techniques. However, in the case of optogenetic interventions, this would have to be preceded by stereotactic micro-infusion of a virus to locally express light-sensitive or other proteins.

---

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

The coherence between the above outlined components stems from the overarching goal to identify and characterize neural substrates for compulsive behavior and its “building blocks” (i.e., provide a better understanding of the neurobiology of compulsive behavior; **see flow chart**). Specifically, in each component either behaviors or measures of brain activity that are associated with compulsivity are studied. In order to do so, a variety of motivated behaviors thought to constitute or contribute (or both) to compulsivity will be studied while neural recordings and stimulations are performed. All components

taken together are capable of accomplishing this goal. Thus, the primary logical structure of the approach is 1) to establish a specific rodent behavior of interest, then 2) to identify and measure brain regions that may be involved, then 3) to manipulate that brain region and assess its effect on behavior, and finally either 4) to assess its effect on other brain variables *during* behavior, or 5) in anesthetized animals. Although all these components are intended to be tied together by logic and temporal sequence, it is important to note that they can be executed independently or in different sequences – often, these experiments may not follow this logical path and different experiments will not be developed in a synchronous manner. For example, in case we already have information from our own studies or those from other labs indicating a specific brain region in a common behavioral assay, we may skip measuring from this brain region first and go straight to manipulating it. Or we use behavioral paradigms that are already established in our group and directly combine these with an intervention procedure based on pharmacogenetics. Or we may start out with component 5 to establish whether a certain assumed anatomical connection in the brain is capable of inducing molecular or physiological changes in another region of interest. Only after this functional connection is established, will a follow-up behavioral study be conducted.

It is important to note, that there is some overlap between the animal studies described in this project and those in earlier DEC-approved protocols. After a license for this project has been obtained, all experiments will formally be executed under this new license.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	<b>Establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its components</b>
2	<b>Identification of brain correlates of compulsive behavior and its components</b>
3	<b>Establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation</b>
4	<b>Establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation</b>
5	<b>Identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation</b>
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Nederlands Herseninstituut - KNAW	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number  3.4.4.1	Type of animal procedure  <b>Establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its component</b>

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### The general research questions addressed in our project are:

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

##### The aim of the procedures described in this appendix (3.4.4.1) is to answer the above questions 1 and 2:

- A. to establish and validate animal models for compulsive behavior;
- B. to characterize the tested population of animals (mice and rats) for individual differences;
- C. to establish and validate behavioral methods to assess components of compulsive behavior, such as habit formation and cognitive flexibility;
- D. to characterize the compulsivity in relation to its behavioral components.

##### The main outcome parameter of these procedures is behavior.

The behavioral procedures are meant to be used also in the subsequent appendices (3.4.4.2, 3.4.4.3 and 3.4.4.4). The results obtained form the basis to choose the best procedures and components to be used in combination with neuronal measurements and/or interventions. It is important to have these procedures validated and ready to use before the combination with invasive measurement and intervention methods, so that the behavioral procedures in animals with implants only will require some

fine-tuning.

Below the general organization of the experiments is outlined. We've chosen a selected number of compulsivity models, component behaviors and measurement techniques that will be the first focus of our attention. The remaining (second tier) models, components and techniques will later be used to extend findings and solve questions that are still unanswered after the first tier of experiments.

**A. Introduce and validate models for compulsive behavior, so that they can be applied to answer our scientific questions.**

We have chosen three rodent models as first tier models to start our studies. The choice was based on providing the best opportunity to discover a common neurobiological mechanism of the different compulsive phenotypes. The models are: Sapap3-mutant mice (compulsive grooming based on a genetic deletion of a postsynaptic density protein in the striatum); cocaine self-administration in rats (compulsive cocaine seeking and taking despite punishment); quinpirole-induced compulsive checking in rats (behavioral changes following repeated quinpirole administration). These are our first tier models, but they may be extended or replaced by other pharmacological, behavioral, genetic, and addiction models (via notification of the IvD), in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available.

The use of mice in addition to rats is based on the fact that transgenic mice such as the Sapap3-mutant mice are up to now the only model with spontaneous compulsive behavior, where no additional pharmacological treatment or behavioral training is required. The validation of the compulsive self-administration models (using cocaine or other drugs of abuse) depends on a test in which responding for the drug is punished. Compulsive animals will continue to respond despite the electrical foot shocks or substances that induce taste aversion (e.g., lithium chloride) that they receive.

**B. Answer the scientific question how strong the individual differences are for the animal models of compulsivity that are validated under A.**

Studying individual differences in behavior is an old approach that has proven its value over and over again. By studying the individual differences in compulsive behavior we aim to increase the chance that we will discover its underlying neurobiological mechanism. We already have experience with individual differences in two of our three first tier models, compulsive cocaine self administration (where only a limited number of rats will reach a level of compulsivity where they accept receiving foot-shocks when responding for cocaine) and Sapap3-mutant mice (where we find a high variability in the time spent grooming and where only intensely grooming mice respond to deep brain stimulation with a decrease in grooming).

We will follow this up by behaviorally testing animals from different strains and from lines with different genetic modifications. Initially, we will use two rat strains (our standard strain, Long Evans and another, to be selected on an expected clear difference in behavior) and two transgenic mouse strains (i.e. Sapap3-mutants and another, to be selected on an expected clear difference in behavior from our standard controls, C57Bl/6).

Another factor related to this is gender. For studies where animals are bred in our lab, we intend to use both males and females and this will provide us with the opportunity to collect important information on sex differences in compulsivity and the relation to underlying neurobiological mechanisms between sexes (see also section B. "The animals").

**C. Introduction and validation of the "component" paradigms, so that they can be combined with the models for compulsive behavior and applied to answer our scientific questions.**

The composition of compulsive behavior can be described as separate components: 1) persistence of performance, 2) elicitation of undesirable consequences, 3) escalation of symptoms over time, 4) aggravation by stress and anxiety, 5) exaggerated habit formation, 6) response inflexibility, and 7) loss of voluntary control. Whereas 1), 2), 3) and 7) are components that cannot be studied separately from the compulsive phenotype itself, 4), 5) and 6) may exist in the normal population and lower the threshold for compulsive behavior to develop. Our first interest is in the possible contribution of exaggerated habit formation and the relation of compulsivity with anxiety, but, dependent on the results obtained, the progress in the field and on the nature of the compulsivity models, we may later decide to focus on cognitive flexibility and the interaction with stress, as well. In the latter component we include the positive counterpart, i.e. possible alleviation of compulsivity by providing environmental enrichment. Methods for fear learning may be established and validated when results with the other tests or new publications or hypotheses would make this test valuable to combine with models for compulsivity. The cognitive flexibility component incorporates (through its training stages) also operant reward learning and decision-making. The habit test also based on operant reward responding, which, dependent

on the training schedules, leads to goal-directed or habit behavior. This is validated by using an outcome devaluation test, where the reward (outcome) is made less valuable for the animals, through pre-feeding or through association with sickness, induced by lithium chloride.

Anxiety is tested in an acute procedure, through exposure of the animal to an elevated-plus maze or an open field. Fear learning is tested in an associative procedure where the animal learns that a cue signals a foot-shock.

As these procedures need to be used in both rats and mice, they will be developed in validated in both rats and mice.

Interaction with stress generally will involve chronic exposure to various stressors (e.g. social defeat, restraint, forced swimming, foot-shocks, corticosterone administration). The positive counterpart of stress (environmental enrichment) involves social housing in regularly changing environments, e.g. large cages with many different components that are frequently altered, moved etc. We will use this type of enrichment to reverse or protect from compulsive behavior. Acute exposure to stress may also interact with compulsive behavior (only a single exposure) and will thus be implemented as well.

As it will need to be established what the best order of testing is for the combined experiments under D), in the procedures under C) we test the different options (see further under D)).

**D. Answer what the relation is between compulsive behavior (in one of the models described under A and B) and separate components of that behavior (as described under C).**

The three first tier models of compulsivity will be used while before or after the actual measurement of compulsive behavior the component behaviors are assessed.

Different orders of experimental tests may apply for different combinations. Thus, compulsivity testing in Sapap3-mutant mice involves the recording of spontaneous behavior. In the developmental course of the mice this may be repeated with regular intervals, so that the development of the compulsive grooming is followed. The anxiety test can also be repeated, so that over a long time course a possible relation between the two can be studied. In case of interaction with chronic stress or enrichment, compulsive grooming may be recorded both before and after the stress/enrichment exposure. Operant tests in the Sapap3-mutant mouse should preferably be performed at relatively young age, as responding is affected when the mice grow older and have a higher chance of developing lesions.

The training procedure for rats to reach a stage of compulsive cocaine self-administration is long. While anxiety testing can easily be combined with this, the other procedures require extended training periods as well, either for chronic exposure (stress, enrichment) or for (habit or flexibility) training. To keep experiments at a reasonable duration, we need to establish under C) in what order to apply a combination of tests/treatments. Similarly, establishment of experimental order apply to the combination of quinpirole treatment and the operant (habit/flexibility) tests.

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

First tier **models** of compulsivity.

1. Sapap3-mutant mice are tested for spontaneous compulsive grooming behavior by introduction in a relatively large open field, where they are left for approximately 30-90 min. Grooming behavior generally increases when the animals get older and testing is repeated with approximately a monthly frequency. Animals are regularly (first weekly, when bare spots of skin develop, daily) monitored. They are removed from the experiment and euthanized when discomfort exceeds moderate. Sapap3-mutants are an example of the group of genetic compulsivity models - all showing increased grooming behavior. Other genetically manipulated lines may be added to or replace the Sapap3 mice in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available.

Observation period: up to 10 months. Observation test: once monthly for 1-2 h.

2. Quinpirole-treated animals are treated with quinpirole on a daily or twice weekly basis. After the administration they are placed in an open field, T-maze or other environment that they can explore. Compulsive behavior is maximal after 10-15 injections and may remain present for one to several weeks. Compulsive behavior is tested by observation of checking the open field, or making choices for reward collection in the T-maze (for this, animals need to be food-restricted and kept at 85±5% of their free feeding weight). Quinpirole-treated rats present an example of the group of pharmacological compulsivity models – all depending on 1-3 weeks of drug administration and showing stereotyped or ritualized behaviors. Other models may be added to or replace the quinpirole-treated rats (after consultation of the IvD), in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Quinpirole administration: 2-6 weeks; testing 2-4 weeks; total 1-

3 months.

An alternative version of this procedure is to combine the quinpirole administration with an operant procedure in which chronic quinpirole also increases checking behavior. Rats are kept at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight.

Operant training: 2-4 weeks; quinpirole administration with continued training: 2 weeks; testing: 2-4 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

3. Cocaine (or other drugs of abuse) self-administration requires the placement of an intravenous catheter (under adequate anesthesia and analgesia) for delivery of the drug. Following this, they are housed separately. After a recovery period of at least one week, the animals will be allowed to self-administer drugs of abuse through this catheter over a period of up to 3 months. Blood samples will subsequently be collected at different time intervals (less than 10 times during 48 hours) using the cannulas to determine the concentration of the substance and the expression of biomarkers. The final phase includes responding for cocaine when additionally a foot shock is delivered. In the course of the training, a period of abstinence is included, which will lead to mild to moderate discomfort in the case of cocaine and moderate discomfort when heroin is used. Cocaine self-administering rats present an example of the group of addiction compulsivity models, all showing escalating self-administration and progression to validated compulsive behavior. Other models (e.g. heroin self-administration) may be added to or replace the cocaine rats in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Surgery 1-2 weeks; daily training: 3 months; testing: 1 week; total: up to a maximum of 6 months.

Second tier models of compulsivity.

4. Repeated optogenetic stimulation of the brain (e.g., medial orbitofrontal cortex) has been described in mice, but would also be applicable in rats. This involves stereotactic microinfusion of AAV in the medial orbitofrontal cortex to express light-sensitive proteins and placement of an optic fiber in the same area or in the medial striatum (under adequate anesthesia and analgesia). After a recovery period of at least three weeks, the animal is once daily stimulated while in an open field. Repeated stimulation leads to increased grooming, which is recorded 1 h after the stimulation. After withholding stimulation, grooming is increased for another two weeks.

Surgery and virus expression: 3-4 weeks; daily stimulation and testing: 1-2 weeks; further testing 1-2 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

5. Schedule-induced polydipsia is induced when rats are trained in an operant box (maintained at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight) under a reinforcement schedule, where pellets are delivered into the experimental apparatus approximately every minute. Due to this frequent, spaced out delivery of small amounts of food, a proportion of the animals strongly increase their water intake (a water bottle is present in the experimental apparatus)

Daily training & testing: up to a maximum of 3 months.

6. Signal attenuation is tested when rats or mice (maintained at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight) first learn to associate reward delivery with a cue (signal) and are then exposed to the signal in the absence of reward delivery. In the final test, this group shows more irrelevant responses than a regular extinction group. Daily training 1-4 weeks; testing 1 week; total: up to a maximum of 3 months.

**In the majority of cases, only a single model of compulsivity (see 1.-6. above) will be used in a single animal. In a minority of cases, a maximum of two of the six models listed above will be used in a single animal (e.g., optogenetic generation of compulsivity in SAPAP3 mice).**

Components of compulsivity.

1. Anxiety testing. In behavioral tests for anxiety, the animals' general anxiety is tested by measuring their avoidance of the center of an open-field box or the amount of time spent away from exposed parts of an elevated plus maze. This is a short, acute test which may be repeated e.g. throughout the life of a Sapap3-mutant, or before and after development of cocaine- or quinpirole-related compulsive behavior. No training. Test < 1 day, repeated 2-3x over a maximum of 2-6 months.

2. Habit formation. Food restricted animals ( $85\pm 5\%$  of their free feeding weight) are trained in rewarded operant tasks favoring either habitual or goal-directed behavior and tested following pre-exposure to the rewards or by induction of taste aversion by pairing the reward with e.g. lithium chloride. Alternatively, habitual or goal-directed avoidance behavior (responding to avoid a mild foot-shock) may be acquired



and tested by pre-exposure to punishments (e.g., mild shock). Daily training: 1-3 months; test up to 8 days.

3. Cognitive flexibility. Food-restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained to make choices in operant tasks (in operant boxes or on cross- or T-mazes) and are exposed to a novel situation during the test. Depending on the level of flexibility tested, daily training continues for 2 weeks to 3 months and flexibility can be tested in one day at several stages during acquisition. Signal attenuation holds an intermediate position between models for compulsivity and a component of compulsivity and may be applied as a flexibility test in models of compulsivity as well.

4.a. Repeated stress exposure. Animals undergo repeated/chronic stress (e.g. social defeat, restraint, forced swimming, corticosterone administration) or repeated injections of stress hormones. Daily exposure to one of the stressors. Total: 2-4 weeks

To assess the effect of stress exposure and corticosterone administration, plasma samples will be taken in some animals after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.b. Chronic environmental enrichment. Animals undergo repeated/chronic exposure to positive stimuli by continuously altering environmental enrichment of the home cage. Exposure is continuous, with daily environmental alterations. Total: 1 month

To assess the effect of enrichment, plasma samples will be taken after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.c. Acute stress exposure. Animals will be exposed to restraint, foot-shocks, TMT-odor (fox urine), or social defeat. Exposure depending on the stressor type maximally 1,5 h, once, immediately before a compulsivity or other test.

5. Fear conditioning. Animals are exposed to foot shocks paired with environmental cues. Punishments include mild electrical foot shocks (delivered in an automated behavioral testing system (operant box)). Outcome measures are for example cue-induced freezing. Daily training: up to 1 week; test: 1-2 days. Potentially repeated 2 times over a maximum of 2-6 months.

**In the majority of cases, models (above, 1. through 6.) and components (above, 1. through 5.) will be tested for 3 months at the maximum. However, on average tests will be substantially shorter. On the other hand, in a few cases the maximum 3 months will be exceeded: Up to three behavioral tests will be combined in such cases (3 x 3 months or 3 + 6 months = 9 months). Absolute maximum duration of such test combinations is thus 9 months.**

The duration of all procedures described in appendices 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4 are fully determined by what is outlined in 3.4.4.1, with the addition that measurements and interventions are conducted in this time period.

A lot of the components need to be tested in combination with different compulsivity models in order to identify which components are most influential. However, there are a number of combinations and experimental scenarios that are not going to be employed by us, because they are not useful in targeting the questions that we are trying to investigate. In general, compulsivity models will be used in combination with a maximum of three compulsivity component tests. In no case/scenario will the cumulative discomfort exceed moderate levels (i.e., component testing will always be temporally separated).

*Not going to be used:*

- fMRI scanning of mice (SAPAP3 or any other mice)
- fear conditioning (component 5) and stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c))
- fear conditioning (component 5) and quinpirole (model 2)
- fear conditioning (component 5) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- signal attenuation (model 6) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c)) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)

Testing of females. When we use female animals, estrous cycle will be checked frequently to control for potential sex hormonal effects on behavior and to determine when to conduct crucial parts of the

experiments. A small subset of female animals (under proper anesthesia and perioperative analgesia) is ovariectomized to control for variability due to estrous cycle. Surgery and recovery: 1 week.

At the end of the experiment, animals with catheters, intracranial virus injections, repeated quinpirole treatments, chronic stress exposure and all Sapap3-mutant mice will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry, and histology.

A small subset of these animals (up to 25% but likely much less) may be used for the terminal experiments under anesthesia (3.4.4.5), for measurement of neuronal activity following acute intervention with brain activity. A small subset of these animals that were exclusively tested for rewarded behavior may be available for use in other experiments, as well.

---

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

Pilot experiments: establishing new or adapted behavioral procedures requires step-by-step introduction and adaptation on the basis of obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Qualitative analysis: when experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis: when experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

---

## **B. The animals**

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

Species used:

Mice (*mus musculus*): genetically modified and wild type; mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.

Rats (*rattus norvegicus*): genetically modified and wild type; rats are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.

Rats and mice are the best investigated mammal species used for fundamental research with significant knowledge about the anatomy and physiology of the rodent brain. The latest, most sophisticated technologies for investigating brain mechanisms are made for use in these species, including a variety of genetically engineered strains. It is required to use both strains because each strain offers specific advantages. Rats exhibit a greater spectrum of complex behaviors that are essential for assessing compulsive behavior and its components (and some genetic tools are available for rats). In addition, measurement techniques are more widely available and more easily applicable in rats.

In contrast, many genetic tools are available for the manipulation of neuronal activity in mice (but mice exhibit a narrower spectrum of complex behaviors). The use of mice in addition to rats is mainly based on the availability of transgenic mice showing increased spontaneous grooming (no additional pharmacological treatment or behavioral training is required), such as the Sapap3-mutant mouse, which has been validated as an animal model for obsessive-compulsive disorder. Another factor is the possibility to study individual differences, where e.g. the fact that we breed transgenic mice (such as Sapap3-mutants) ourselves provides a natural opportunity to study individual differences.

Sex used: We aim for efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house. In most other cases, males are used as they present the standard sex in the literature and almost all reference protocols and publications are based on the use of male rodents. Up to now, the overwhelming majority of behavioral and physiological studies on compulsivity in animals was carried out in male rodents. However, sex differences in clinical compulsivity have been reported. We plan to evaluate the experience of studying sex differences and decide if using female rodents in other parts of this project would be of scientific value. Since we aim for an efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house, in some cases both males and females are used in the same experiment. In case sex differences become focus of an experiment, it is necessary to use males and females in the same conditions and during the same time period to be able to properly compare them.

---

Animal number: All animals will be young adults or adult at the start of the experiments. The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years with the introduction of new paradigms and techniques. Thus, there are some factors involved that cannot be determined precisely. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Behavioral studies contain an average of 10 rats or mice for each experimental group and control groups. Individual differences will be tested in 20 animals. Based on the present plans (most experiments will last about one month; 14 operant boxes for behavioral testing will be available for parallel use; behavioral test sessions last for about one hour) and accounting for a range of second tier models of compulsivity we will use 1500 animals in this appendix, 500 mice and 1000 rats. Of these, approx 30% will be exposed to mild and 70% to moderate discomfort.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Behavior is the important parameter measured in these experiments and the use of intact, awake animals to perform behavioral experiments is inevitable. Behavior is a complex phenomenon and the development of compulsive behavior cannot be modeled in cell cultures or lower animal species than mammals. For measurements of brain activity or for altering that activity during compulsive behavior an intact brain is needed, as well.

We have direct and intensive contact with psychiatrists who study compulsive behavior in patients and use the most advanced techniques to measure brain activity in humans. A continuous interaction with the clinicians ensures that we will always be informed of possible alternatives for animal research. However, the possibilities for invasive measurements in the human brain are restricted and the highly selective and sensitive techniques that we have available for measurement and stimulation of brain activity can as yet only be applied in (transgenic) animals.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. It is necessary to use both species because each of them offer specific advantages: Rats have a greater range of complex behaviors enabling better assessment of cognitive functions; more genetic tools and mutants are available for mice and one of our most important animal models is a mutant mouse strain.

We will use both male and female rats and mice in the case of the (transgenic) animals that are bred in house. This will lead to a reduction of "breeding surplus".

Although most of our experiments critically require behavioral naive animals, we will transfer animals to 3.4.4.5 (for further non-behavioral experimentation) whenever possible. This is not possible with animals that have intracranial implants (all of the animals in 3.4.4.2/3/4). However, a certain number (approx. up to 25%) of the animals in 3.4.4.1 will be transferred to one of the other procedures, most of them in 3.4.4.5 (terminal experiments under anesthesia).

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies (pilots) will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. All novel behavioral paradigms and measurement and intervention technique will first be introduced in treatment-naïve animals in small, pilot groups and only be used in full experiments when the procedure is validated. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the

maximum number of animals needed to obtain interpretable data.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and clearly defined humane endpoints applied. Animals will be allowed to recover from surgery for one week. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Mice will be handled using the tube method (Hurst & West, 2010) if possible, this reduces stress resulting from interactions with the experimenter.

Plasma sampling in animals for the measurement of cocaine or corticosterone concentrations in rats or mice, will be within in recommended/allowed limits.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.  
Adverse environmental effects are not present.

Rats and mice will be socially housed if possible (unless food-restricted or implanted with a device, in that case animals are single-housed because they would damage each other's implants) and provided with environmental enrichment (see also F.). Furthermore, animals will be handled starting up to 2 weeks before start of the experiments and they will be habituated to the experimental setup several times before testing.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

In a subset of cases, such as after implantation of optic fibers, intravenous catheters etc., animals will be housed solitary. This is done because otherwise cage mates will damage these implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. We will limit the single housing in the duration to the minimum period necessary.

In some cases, food restriction needs to be combined with isolated housing, when socially housed animals do not receive the amounts of the food needed to maintain their body weight at  $85 \pm 5\%$  of their free feeding weight. The re-introduction of animals to established groups will be carefully monitored to avoid problems of incompatibility and disrupted social relationships.

### G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and

treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or simulate chronic stress). All other procedures (67%) do either not produce pain or pain when is experienced, analgesia is provided (e.g., in surgical interventions adequate analgesia will be used).

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

Proper anesthesia and analgesia is used for all procedures that are not related to experimental testing (see above under "No"), which is primarily surgery.

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

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

1. Sapap3-mutant mice show increased grooming, which by itself brings no additional discomfort, but may lead to bare spots of skin and finally to skin lesions, and maximally moderate discomfort.
2. Quinpirole injections leads to a certain period (up to 1 h) of disturbed behavior and sometimes signs of increased anxiety, associated with maximally moderate discomfort.
3. It is difficult to estimate if animals experience discomfort when they develop compulsive behavior. We estimate that by itself, increased grooming or increased operant responding does not lead to discomfort.
4. Animals addicted to cocaine or heroin do not seem to experience discomfort as long as they are able to obtain the drug. During extinction tests, animals will experience discomfort because of withdrawal symptoms. The severity varies for different drugs: cocaine abstinence is estimated as causing mild to moderate discomfort, heroin abstinence as moderate discomfort. Discomfort is highest on the first day and becomes less on subsequent days.
5. In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or induce chronic stress). Animals tested for levels of compulsivity or fear conditioning will experience repeated foot-shocks in daily sessions for 1-2 weeks, leading to no more than moderate discomfort. Animals tested for the effects of stress-induced aggravation of compulsivity will experience increased stress from daily exposure to one of several stressors for the duration (2-4 weeks) of the exposure, leading to moderate discomfort.
6. Food restriction to  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight leads to initial mild discomfort, which decreases or disappears upon habituation during further training and testing.
7. Chronic stress-exposed animals with catheters for plasma sampling need to be handled leading to repeated mild discomfort.
8. Recovery from stereotactic surgery and implantation of catheters may lead to maximally moderate discomfort.
9. Other aspects that may compromise the welfare of the animals are:
  - Unforeseen surgical complications, such as excessive bleeding, adverse reactions to the applied anesthetic, or accidental severing of nerve fibers or blood vessels.
  - Inflammation in the tissue around implanted devices such as intravenous catheters.
  - During intravenous drug self-administration animals sometimes overdose.
10. All animals will be frequently monitored for possible side effects. Animals exhibiting an unexpected phenotype with discomfort will be sacrificed immediately.

Explain why these effects may emerge.

Mild to moderate discomfort in the above examples 1-7 are inherent to the models of compulsivity and to the measurement or intervention techniques, while example 8 is inherent to surgical procedures.

Surgical procedures cannot be executed with 0% failure rate and very seldom increased postoperative bleeding leads to maximally moderate discomfort.

There is considerable variability within rodent populations regarding the sensitivity to anaesthetics and drugs.

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

Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD or veterinary officer. Possible treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

For intravenous drug self-administration a maximum number of drug infusions is programmed into the software controlling the infusion pump.

The intensity of foot-shocks is limited to the lowest effective combination of current strength and duration. Foot-shock intensity will never exceed 1 mA.

If animals are on a food-restriction regimen, they are weighed each day and the amount of food given is adapted to keep the weight at  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight.

#### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The maximum degree of cumulative discomfort in any combination of tests/measurements/interventions will not exceed moderate discomfort. Animals will be euthanized with pentobarbital (applied by i.p. injection), if:

1. Persistent weight reduction (i.e., 20% or more compared to the weight at the experimental start in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals), or acute weight loss within 2 days (15% in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals) leading to more than moderate discomfort.
2. Abnormal behavior and/or posture, immobility, dirty fur, and other signs of distress, sickness, other unexpected circumstances leading to more than moderate discomfort.
3. Open wounds in Sapap3-mutant mice leading to more than moderate discomfort (10-20 % of older (> 6 months) mice; almost none in younger Sapap3-mutants).

Indicate the likely incidence.

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

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

We will use 1500 animals in this appendix, 500 mice and 1000 rats. Of these, approx 30% will be exposed to mild and 70% to moderate discomfort.

Of the compulsivity models, Sapap3-mutants may develop lesions. We estimate that in the course of the experiments 75% will experience maximally mild discomfort and 25% max moderate. If we expect that the discomfort will further increase, the animals are euthanized.

The addiction models all undergo surgery, may experience abstinence and foot-shocks when compulsivity is validated, together leading to maximally moderate discomfort.

The optogenetic stimulation models also undergo surgery, leading to max moderate discomfort.

Quinpirole and other pharmacological models may experience transient moderate discomfort.

During fear conditioning and chronic stress, animals may also experience moderate discomfort. All other animals (including most control groups) will experience no more than mild discomfort (food restriction plus behavioral testing).

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Some animals (up to 25%) that were used for rewarded behavior in this appendix are available for use in other experiments and will not be sacrificed under this appendix (the majority of these 25% percent will be used for the terminal experiments under appendix 3.4.4.5).

All other animals will receive an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry and histology.

Subsequently, protein expression following virus injections, localization of implanted fibers and possible brain pathology in compulsivity models will be assessed.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Nederlands Herseninstituut - KNAW	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.2	<b>Identification of brain correlates of compulsive behavior and its components</b>

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### **The general research questions addressed in our project are:**

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

##### **The aim of the procedures described in this appendix (3.4.4.2) is to answer the above question 3:**

- to measure brain activity in behavioral paradigms for compulsive behavior and its components (such as habit formation or cognitive flexibility) in order to unravel the neurobiological underpinnings of this behavior.

##### **The main outcome of these procedures in neuronal activity, in combination with behavior.**

Thus, in these procedures behavioral tests described under 3.4.4.1 will be combined with one of the following "neuro-measurement" techniques to measure brain activity in awake rodents in our lab:  
Measure-1) electrophysiology to assess neuronal firing and brain network activity  
Measure-2) electrochemistry to assess fast neurotransmitter release (e.g., fast-scan cyclic voltammetry)  
Measure-3) microdialysis to assess slow neurotransmitter release  
Measure-4) calcium imaging to assess neuronal ensemble activity  
Measure-5) functional magnetic resonance imaging (fMRI) to assess whole-brain activity.

A maximum of two "neuro-measurement" techniques will be used in a single animal. In the vast majority



of cases only a single measurement technique is used in a single animal.

Both neuronal activity and neurotransmitter release are studied and measurements focus on both local and global processes. We need such an array of measurement techniques to increase the chance that we can identify the neurobiological correlates of the behavior studied and thus find targets for subsequent (3.4.4.3) intervention experiments.

Below the general organization of the experiments is outlined. We've chosen a selected number of compulsivity models, component behaviors and measurement techniques that will be the first focus of our attention. The remaining (second tier) models, components and techniques will later be used to extend findings and solve questions that are still unanswered after the first tier of experiments.

The general organization is:

A) to establish and validate the measurement techniques in animal models for compulsive behavior – in pilot experiments the first steps are taken, until a satisfactory paradigm is obtained; that paradigm will be used (in 3.4.4.1).

B) to measure the neuronal activity parameter in the animal models – will deliver data of neuronal activity during compulsive behavior.

C) to establish and validate the measurement techniques when components of compulsive behavior are studied in animal models of compulsive behavior – in pilot experiments the first steps are taken, until a satisfactory paradigm is obtained; that paradigm will be used.

D) to measure the neuronal activity parameter in the animal models while they are engaged in one of the components – will deliver data of neuronal activity during habit formation etc. in compulsive animals.

All neuro-measurement techniques (3.4.2.2) will require intracranial (technical) implants mounted to the skull of the animals with screws and dental cement. Measure-1 to 4 require tethering of the animals from their cement head caps (implants differ slightly depending on the technique) to commutators (connected with technical equipment) to allow animals to move freely during the behavioral assays. Measure-5 (and in some cases Measure-4, when needed, so also D) requires head re-straining because movement artefacts will otherwise prevent measurements. The use of behavioral tests in combination with 4) is restricted and will mainly concern inducing a compulsive phenotype before measurements of possible alterations of resting state activity with fMRI. Pilot experiments (C) to combine conditioning tests (both appetitive and aversive) with fMRI measurements will be initiated and should lead to formal experiments under D.

---

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

Neuro-measurements are carried out in animal models of compulsivity and their controls. We'll start with our three first tier models (Sapap3-mutant mice, quinpirole-treated rats and cocaine self-administering rats) and combine these with 3 measurement techniques (electrophysiology, fast-scan cyclic voltammetry and fMRI). Electrophysiology and voltammetry will be used in all 3 models, but fMRI will be restricted to rats in the cocaine self-administration and quinpirole models.

When such measurements are combined with components of compulsivity the standard is to test anxiety and one other component (i.e., either habit formation, cognitive flexibility, sensitivity to stress, or fear conditioning). We'll first focus on habit formation, later on cognitive flexibility.

This procedure can consist of the following steps:

1. All animals (wild type or genetically manipulated) are housed together in single-sex groups until they become at least young adults (8 weeks of age). Two weeks before the start of behavioral experiments animals will be handled and weighed frequently.
2. Measurement equipment is implanted into the animals' brains through holes that are drilled into the skull (under adequate anesthesia and analgesia). In case of calcium imaging (Measure-4), a virus that will express Ca-indicating proteins, is infused (under adequate anesthesia and analgesia; at least 3-4 weeks recovery from this surgery to allow the virus to express). Animals will recover from anesthesia for at least one week.
3. Measurements in a model for compulsive behavior (group B) or compulsive behavior *and* its components (group D). Pilot experiments in groups A and C are used to establish the optimal sequence and timing of events.

Procedures Measure-1 to 4 (electrophysiology, voltammetry, microdialysis, Ca-imaging):

After the animals are connected to the recording/measuring set-up, they can move freely in the test box or test maze. The total time in the test will vary between 2-9 h. Daily electrophysiology and voltammetry

measurements can continue for up to 3 months. Microdialysis measurements can be repeated once. Ca-imaging can be repeated. Pilot experiments will be needed to establish the frequency and maximum number of measurements – a task that will involve frequent consultation of the IvD.

Procedures Measure-4 and Measure-5 (Ca- and fMRI-imaging):

Scanning animals in a MRI scanner (and in some cases calcium imaging (when using chronically implanted imaging windows)) requires head restraining to minimize head-movement-induced artefacts in the measurements. We follow a training protocol of 5 consecutive days with a duration of up to one hour each which reduces stress responses (corticosterone levels and observed restrained behavior). Non-coping animals will be removed from the experiment. After restraint training sessions concluded, animals will be transported to the MRI scanner (or calcium imaging apparatus). There the animals will be placed inside the scanner bore in our restrainer device, which has room for a custom build head coil specifically designed for rodents (and room for connecting the calcium imaging equipment).

Training duration: 1-2 weeks. Both Ca- and fMRI imaging may be repeated. Pilot experiments over the course of several months will be needed to establish the frequency and maximum number of measurements.

Sequence of experiments. Most of the models of compulsivity and also most of the components need acquisition/treatment periods of several weeks. The optimal sequence of events (compulsivity acquisition, intracranial implantation and measurements, acquisition of components) may vary: in group B the sequence may be implantation, measurement during compulsivity acquisition and expression; in group D: compulsivity acquisition, implantation, measurement during component acquisition (habit, flexibility, fear conditioning) or, alternatively, component (chronic stress or enrichment), implantation, compulsivity acquisition. The most suitable sequence (in terms of measurement success and animal discomfort) will be selected in pilot experiments in C).

First tier **models of compulsivity (text identical to 3.4.4.1 is indicated in italics).**

*1. Sapap3-mutant mice are tested for spontaneous compulsive grooming behavior by introduction in a relatively large open field, where they are left for approximately 30-90 min. Grooming behavior generally increases when the animals get older and testing is repeated with approximately a monthly frequency. Animals are regularly (first weekly, when bare spots of skin develop, daily) monitored. They are removed from the experiment and euthanized when discomfort exceeds moderate. Sapap3-mutants are an example of the group of genetic compulsivity models - all showing increased grooming behavior. Other genetically manipulated lines may be added to or replace the Sapap3 mice in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available.*

*Observation period: up to 10 months. Observation test: once monthly for 1-2 h.*

*2. Quinpirole-treated animals are treated with quinpirole on a daily or twice weekly basis. After the administration they are placed in an open field, T-maze or other environment that they can explore. Compulsive behavior is maximal after 10-15 injections and may remain present for one to several weeks. Compulsive behavior is tested by observation of checking the open field, or making choices for reward collection in the T-maze (for this, animals need to be food-restricted and kept at 85±5% of their free feeding weight). Quinpirole-treated rats present an example of the group of pharmacological compulsivity models – all depending on 1-3 weeks of drug administration and showing stereotyped or ritualized behaviors. Other models may be added to or replace the quinpirole-treated rats (after consultation of the IvD), in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Quinpirole administration: 2-6 weeks; testing 2-4 weeks; total 1-3 months.*

*An alternative version of this procedure is to combine the quinpirole administration with an operant procedure in which chronic quinpirole also increases checking behavior. Rats are kept at 85±5% of their free feeding weight.*

*Operant training: 2-4 weeks; quinpirole administration with continued training: 2 weeks; testing: 2-4 weeks; total: up to a maximum of 3 months.*

*3. Cocaine (or other drugs of abuse) self-administration requires the placement of an intravenous catheter (under adequate anesthesia and analgesia) for delivery of the drug. Following this, they are housed separately. After a recovery period of at least one week, the animals will be allowed to self-administer drugs of abuse through this catheter over a period of up to 3 months. Blood samples will subsequently be collected at different time intervals (less than 10 times during 48 hours) using the cannulas to determine the concentration of the substance and the expression of biomarkers. The final*

phase includes responding for cocaine when additionally a foot shock is delivered. In the course of the training, a period of abstinence is included, which will lead to mild to moderate discomfort in the case of cocaine and moderate discomfort when heroin is used. Cocaine self-administering rats present an example of the group of addiction compulsivity models, all showing escalating self-administration and progression to validated compulsive behavior. Other models (e.g. heroin self-administration) may be added to or replace the cocaine rats in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Surgery 1-2 weeks; daily training: 3 months; testing: 1 week; total: up to a maximum of 6 months.

#### Second tier models of compulsivity.

4. Repeated optogenetic stimulation of the brain (e.g., medial orbitofrontal cortex) has been described in mice, but would also be applicable in rats. This involves stereotactic microinfusion of AAV in the medial orbitofrontal cortex to express light-sensitive proteins and placement of an optic fiber in the same area or in the medial striatum (under adequate anesthesia and analgesia). After a recovery period of at least three weeks, the animal is once daily stimulated while in an open field. Repeated stimulation leads to increased grooming, which is recorded 1 h after the stimulation. After withholding stimulation, grooming is increased for another two weeks.

Surgery and virus expression: 3-4 weeks; daily stimulation and testing: 1-2 weeks; further testing 1-2 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

5. Schedule-induced polydipsia is induced when rats are trained in an operant box (maintained at 85±5% of their free feeding weight) under a reinforcement schedule, where pellets are delivered into the experimental apparatus approximately every minute. Due to this frequent, spaced out delivery of small amounts of food, a proportion of the animals strongly increase their water intake (a water bottle is present in the experimental apparatus)

Daily training & testing: up to a maximum of 3 months.

6. Signal attenuation is tested when rats or mice (maintained at 85±5% of their free feeding weight) first learn to associate reward delivery with a cue (signal) and are then exposed to the signal in the absence of reward delivery. In the final test, this group shows more irrelevant responses than a regular extinction group. Daily training 1-4 weeks; testing 1 week; total: up to a maximum of 3 months.

**In the majority of cases, only a single model of compulsivity (see 1.-6. above) will be used in a single animal. In a minority of cases, a maximum of two of the six models listed above will be used in a single animal (e.g., optogenetic generation of compulsivity in SAPAP3 mice).**

#### Components of compulsivity.

1. Anxiety testing. In behavioral tests for anxiety, the animals' general anxiety is tested by measuring their avoidance of the center of an open-field box or the amount of time spent away from exposed parts of an elevated plus maze. This is a short, acute test which may be repeated e.g. throughout the life of a Sapap3-mutant, or before and after development of cocaine- or quinpirole-related compulsive behavior. No training. Test < 1 day, repeated 2-3x over a maximum of 2-6 months.

2. Habit formation. Food restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained in rewarded operant tasks favoring either habitual or goal-directed behavior and tested following pre-exposure to the rewards or by induction of taste aversion by pairing the reward with e.g. lithium chloride. Alternatively, habitual or goal-directed avoidance behavior (responding to avoid a mild foot-shock) may be acquired and tested by pre-exposure to punishments (e.g., mild shock). Daily training: 1-3 months; test up to 8 days.

3. Cognitive flexibility. Food-restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained to make choices in operant tasks (in operant boxes or on cross- or T-mazes) and are exposed to a novel situation during the test. Depending on the level of flexibility tested, daily training continues for 2 weeks to 3 months and flexibility can be tested in one day at several stages during acquisition. Signal attenuation holds an intermediate position between models for compulsivity and a component of compulsivity and may be applied as a flexibility test in models of compulsivity as well.

4.a. Repeated stress exposure. Animals undergo repeated/chronic stress (e.g. social defeat, restraint, forced swimming, corticosterone administration) or repeated injections of stress hormones. Daily

exposure to one of the stressors. Total: 2-4 weeks

To assess the effect of stress exposure and corticosterone administration, plasma samples will be taken in some animals after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.b. Chronic environmental enrichment. Animals undergo repeated/chronic exposure to positive stimuli by continuously altering environmental enrichment of the home cage. Exposure is continuous, with daily environmental alterations. Total: 1 month

To assess the effect of enrichment, plasma samples will be taken after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.c. Acute stress exposure. Animals will be exposed to restraint, foot-shocks, TMT-odor (fox urine), or social defeat. Exposure depending on the stressor type maximally 1,5 h, once, immediately before a compulsivity or other test.

5. Fear conditioning. Animals are exposed to foot shocks paired with environmental cues. Punishments include mild electrical foot shocks (delivered in an automated behavioral testing system (operant box)). Outcome measures are for example cue-induced freezing. Daily training: up to 1 week; test: 1-2 days. Potentially repeated 2 times over a maximum of 2-6 months.

**In the majority of cases, models (above, 1. through 6.) and components (above, 1. through 5.) will be tested for 3 months at the maximum. However, on average tests will be substantially shorter. On the other hand, in a few cases the maximum 3 months will be exceeded: Up to three behavioral tests will be combined in such cases (3 x 3 months or 3 + 6 months = 9 months). Absolute maximum duration of such test combinations is thus 9 months.**

The duration of all procedures described in appendices 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4 are fully determined by what is outlined in 3.4.4.1, with the addition that measurements and interventions are conducted in this time period.

A lot of the components need to be tested in combination with different compulsivity models in order to identify which components are most influential. However, there are a number of combinations and experimental scenarios that are not going to be employed by us, because they are not useful in targeting the questions that we are trying to investigate. In general, compulsivity models will be used in combination with a maximum of three compulsivity component tests. In no case/scenario will the cumulative discomfort exceed moderate levels (i.e., component testing will always be temporally separated).

Not going to be used:

- fMRI scanning of mice (SAPAP3 or any other mice)
- fear conditioning (component 5) and stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c))
- fear conditioning (component 5) and quinpirole (model 2)
- fear conditioning (component 5) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- signal attenuation (model 6) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c)) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)

Testing of females. When we use female animals, estrous cycle will be checked frequently to control for potential sex hormonal effects on behavior and to determine when to conduct crucial parts of the experiments. A small subset of female animals (under proper anesthesia and perioperative analgesia) is ovariectomized to control for variability due to estrous cycle. Surgery and recovery: 1 week.

At the end of the experiment, animals with catheters, intracranial virus injections, repeated quinpirole treatments, chronic stress exposure and all Sapap3-mutant mice will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry, and histology.

Some of these animals (up to 25%) may be used for the terminal experiments under anesthesia (3.4.4.5), for measurement of neuronal activity following acute intervention with brain activity. A subset of these animals that were exclusively tested for behavior may be available for use in other experiments, as well. As all animals are implanted with electrodes, equipped with head posts etc. and have been through long behavioral procedures, they are not available for re-use in any protocol involving behavior.

After completion of the collection of data, the animals will be sacrificed (overdose of Nembutal and perfused for brain fixation) and their brains will be collected for histology and immunohistochemistry (e.g., stains to confirm the localization of the electrodes, or stains to assess the effects of electrode stimulation). In the case of electrophysiology and voltammetry a small electrolytic lesion under proper isoflurane anesthesia will precede the Nembutal treatment and perfusion.

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

Pilot experiments: Establishing new or adapted behavioral procedures requires step-by-step introduction and adaptation on the basis of obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Qualitative analysis: when experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on the pilots and on literature data.

Quantitative analysis: when experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

## **B. The animals**

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

### Species used:

*Mice (mus musculus): genetically modified and wild type; mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats (rattus norvegicus): genetically modified and wild type; rats are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats and mice are the best investigated mammal species used for fundamental research with significant knowledge about the anatomy and physiology of the rodent brain. The latest, most sophisticated technologies for investigating brain mechanisms are made for use in these species, including a variety of genetically engineered strains. It is required to use both strains because each strain offers specific advantages. Rats exhibit a greater spectrum of complex behaviors that are essential for assessing compulsive behavior and its components (and some genetic tools are available for rats). In addition, measurement techniques are more widely available and more easily applicable in rats.*

*In contrast, many genetic tools are available for the manipulation of neuronal activity in mice (but mice exhibit a narrower spectrum of complex behaviors). The use of mice in addition to rats is mainly based on the availability of transgenic mice showing increased spontaneous grooming (no additional pharmacological treatment or behavioral training is required), such as the Sapap3-mutant mouse, which has been validated as an animal model for obsessive-compulsive disorder. Another factor is the possibility to study individual differences, where e.g. the fact that we breed transgenic mice (such as Sapap3-mutants) ourselves provides a natural opportunity to study individual differences.*

Sex used: *We aim for efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house. In most other cases, males are used as they present the standard sex in the literature and almost all reference protocols and publications are based on the use of male rodents. Up to now, the overwhelming majority of behavioral and physiological studies on compulsivity in animals was carried out in male rodents. However, sex differences in clinical compulsivity have been reported. We plan to evaluate the experience of studying sex differences and decide if using female rodents in other parts of this project would be of scientific value. Since we aim for an efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house, in some cases both males and females are used in the same experiment. In case sex differences become focus of an experiment, it is necessary to use males and females in the same conditions and during the same time period to be able to properly compare them.*

Animal number: All animals will be young adults or adult at the start of the experiments. The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years with the introduction of new paradigms and techniques. Thus, there are some factors involved that cannot be

determined precisely. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Neuromasurement studies (3.4.4.2) contain an average of 20 animals (experimental group plus controls) plus 2 extra rats or mice for each experimental group and control groups, compared to the purely behavioral experiments of 3.4.4.1. This is to account for drop-out because of mis-placement and/or technical problems over the course of the experiments. Based on the present plans (most experiments will last about one month; 14 operant boxes for behavioral testing will be available for parallel use; behavioral test sessions last for about one hour; on average measurements and interventions are taking place on no more than a third of the overall experimental training days) we will use 1050 animals in this appendix, 350 mice and 700 rats. All (100%) will be exposed to moderate discomfort.

---

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

---

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

No

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

---

### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Behavior is the important parameter measured in these experiments and the use of intact, awake animals to perform behavioral experiments is inevitable. Behavior is a complex phenomenon and the development of compulsive behavior cannot be modeled in cell cultures or lower animal species than mammals. For measurements of brain activity or for altering that activity during compulsive behavior an intact brain is needed, as well.

We have direct and intensive contact with psychiatrists who study compulsive behavior in patients and use the most advanced techniques to measure brain activity in humans. A continuous interaction with the clinicians ensures that we will always be informed of possible alternatives for animal research. However, the possibilities for invasive measurements in the human brain are restricted and the highly selective and sensitive techniques that we have available for measurement and stimulation of brain activity can as yet only be applied in (transgenic) animals. The basic testing of these intervention- and measurement-techniques will be performed as much as possible prior to performing an animal experiment.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. It is necessary to use both species because each of them offer specific advantages: Rats have a greater range of complex behaviors enabling better assessment of cognitive functions; more genetic tools and mutants are available for mice and one of our most important animal models is a mutant mouse strain.

We will use both male and female rats and mice in the case of the (transgenic) animals that are bred in house, this will lead to a reduction of "breeding surplus".

Although most of our experiments critically require behavioral naive animals, we will transfer animals to 3.4.4.5 (for further non-behavioral experimentation) whenever possible. This is not possible with animals that have intracranial implants (all of the animals in 3.4.4.2/3/4).

The measurement techniques that will be most frequently used (electrophysiology and fast-scan cyclic voltammetry) have been developed to allow chronic recordings in each animal. Thus, we will strive to perform experiments where each animal is his/her own control if possible (e.g. stimulation on vs stimulation off – this is also the way in which the clinical experiments are performed). In general, this also increases power and decreases the number of animals required.

Ca-imaging will be carried out using fiber implants and the animals can move around freely during recordings. The use of imaging windows which requires head fixation (and head fixation training) will be

---

avoided as much as possible.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. All novel behavioral paradigms and measurement and intervention technique will first be introduced in control animals in small, pilot groups and only be used in full experiments when the procedure is validated. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the minimum number of animals needed to obtain interpretable data.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and clearly defined humane endpoints applied. Animals will be allowed to recover from surgery for one week. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Mice will be handled using the tube method (Hurst & West, 2010) if possible, this reduces stress resulting from interactions with the experimenter.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

Rats and mice will be socially housed if possible (unless implanted with a device, in that case animals are single-housed because they would damage each other's implants) and provided with environmental enrichment. Furthermore, animals will be handled starting up to 2 weeks before start of the experiments and they will be habituated to the experimental setup several times before testing.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

In a subset of cases, such as after implantation of optic fibers, intravenous catheters etc., animals will be housed solitary. This is done because otherwise cage mates will damage these implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. We will limit the single housing in the duration to the minimum period necessary.

In some cases, food restriction needs to be combined with isolated housing, when socially housed animals do not receive the amounts of the food needed to maintain their body weight at  $85 \pm 5\%$  of their free feeding weight. The re-introduction of animals to established groups will be carefully monitored to avoid problems of incompatibility and disrupted social relationships.

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or simulate chronic stress). All other procedures (67%) do either not produce pain or pain when is experienced, analgesia is provided (e.g., in surgical interventions adequate analgesia will be used.

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

Proper anesthesia and analgesia is used for all procedures that are not related to experimental testing (see above under "No"), which is primarily surgery.

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

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

1. Sapap3-mutant mice show increased grooming, which by itself brings no additional discomfort, but may lead to bare spots of skin and finally to skin lesions, and maximally moderate discomfort.
2. Quinpirole injections leads to a certain period (up to 1 h) of disturbed behavior and sometimes signs of increased anxiety, associated with maximally moderate discomfort.
3. It is difficult to estimate if animals experience discomfort when they develop compulsive behavior. We estimate that by itself, increased grooming or increased operant responding does not lead to discomfort.
4. Animals addicted to cocaine or heroin do not seem to experience discomfort as long as they are able to obtain the drug. During extinction tests, animals will experience discomfort because of withdrawal symptoms. The severity varies for different drugs: cocaine abstinence is estimated as causing mild to moderate discomfort, heroin abstinence as moderate discomfort. Discomfort is highest on the first day and becomes less on subsequent days.
5. In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or induce chronic stress). Animals tested for levels of compulsivity or fear conditioning will experience repeated foot-shocks in daily sessions for 1-2 weeks, leading to no more than moderate discomfort. Animals tested for the effects of stress-induced aggravation of compulsivity will experience increased stress from daily exposure to one of several stressors for the duration (2-4 weeks) of the exposure, leading to moderate discomfort.
6. Food restriction to  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight leads to initial mild discomfort, which decreases or disappears upon habituation during further training and testing.
7. Chronic stress-exposed animals with catheters for plasma sampling need to be handled leading to repeated mild discomfort.
8. Recovery from stereotactic surgery and implantation of catheters may lead to maximally moderate discomfort.
9. Handling animals to connect implanted electrodes etc. to measurement equipment and, following behavioral and measurement sessions, disconnect them leads to repeated mild discomfort.
10. Rats used for fMRI measurements will undergo restraint training, that will not exceed moderate discomfort. Rats showing signs of non-coping will be taken out of the experiment.
11. Other aspects that may compromise the welfare of the animals are:



- Unforeseen surgical complications, such as excessive bleeding, adverse reactions to the applied anaesthetic, or accidental severing of nerve fibers or blood vessels.
- Inflammation in the tissue around implanted devices such as intravenous catheters.
- During intravenous drug self-administration animals sometimes overdose.
- Damage or loss of the head-stage/connector on the skull may lead to moderate discomfort. Animals will be taken out of the experiments when this happens.

Explain why these effects may emerge.

Mild to moderate discomfort in the above examples 1-7 are inherent to the models of compulsivity and to the measurement or intervention techniques, while example 7 is inherent to surgical procedures.

Surgical procedures are subject to human error. These procedures cannot be executed with 0% failure rate and seldomly increased postoperative bleeding leads to maximally moderate discomfort.

There is considerable variability within rodent populations regarding the sensitivity to anesthetics and drugs.

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

Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD or veterinary officer. Possible treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

For intravenous drug self-administration a maximum number of drug infusions is programmed into the software controlling the infusion pump.

The intensity of foot-shocks is limited to the lowest effective combination of current strength and duration. Foot-shock intensity will never exceed 1 mA.

If animals are on a food-restriction regimen, they are weighed each day and the amount of food given is adapted to keep the weight at  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight.

Rats will be extensively handled and carefully trained for fMRI measurements. Rats that do not cope with the restraining training, will be taken out of the experiment. The restraining itself will be carried out under transient, light isoflurane anesthesia.

#### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The maximum degree of cumulative discomfort in any combination of tests/measurements/interventions will not exceed moderate discomfort. Animals will be euthanized with pentobarbital (applied by i.p. injection), if:

1. Persistent weight reduction (i.e., 20% or more compared to the weight at the experimental start in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals), or acute weight loss within 2 days (15% in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals) leading to more than moderate discomfort.
2. Abnormal behavior and/or posture, immobility, dirty fur, and other signs of distress, sickness, other unexpected circumstances leading to more than moderate discomfort.
3. Open wounds in Sapap3-mutant mice leading to more than moderate discomfort (10-20 % of older (> 6 months) mice; almost none in younger Sapap3-mutants).

Indicate the likely incidence.

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

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Level of discomfort: Neuro-measurement studies (as described here in 3.4.4.2 (and the behavioral aspect in 3.4.4.1)) last up to 3 months; up to 6 months when two are combined. In the majority of

paradigms, we food-deprive the animals (mild discomfort). Exceptions are drug self-administration studies (also mild discomfort due to drug withdrawal and catheter implantation) and studies only looking at measures of anxiety (mild discomfort due to experiencing fear and anxiety; or pain due to foot shocks) and spontaneous behavior (no discomfort (if not implanted with a headcap)). Of the SAPAP3 mutant mice, up to 50% will experience mild discomfort due to small skin lesions inflicted by excessive grooming (phenotype); the other 50% will be used before this phenotype develops. In addition, most animals will receive head implants or intracranial injections during a stereotaxic surgery for the measurement of brain activity. The recovery of this surgery is deemed moderate discomfort (for one week). Following recovery, wearing a cement headcap and being tethered to a commutator frequently will induce mild discomfort. Thus, we estimate 100% of the animals to experience mild discomfort throughout the experiments, with a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries. A small percentage of rats (up to 10% will undergo head restraining several times, which induces moderate discomfort.

In total, we estimate that of the 350 mice, 350 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during training of head restraining.

Of the 700 rats, 700 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during head restraining

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals will receive an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry and histology.

Subsequently, protein expression following virus injections, localization of implanted fibers and possible brain pathology in compulsivity models will be assessed.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Nederlands Herseninstituut - KNAW	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	<b>Establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation</b>

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### **The general research questions addressed in our project are:**

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

##### **The aim of the procedures described in this appendix (3.4.4.3) is to answer the above question 4 and 5:**

- to manipulate brain activity in behavioral paradigms for compulsive behavior and its components.

##### **The main outcome of these procedures is behavior.**

Once a behavioral strategy is established and the desired behavior is detected, brain activity during this behavior is manipulated in order to unravel the neurobiological underpinnings of this behavior. To discover causal relationships between brain activity and behavior, behavior will be measured while brain activity is manipulated using the following interventions:

The aim of these procedures is  
Intervent-1) Deep-brain stimulation (DBS)  
Intervent-2) pharmacogenetics  
Intervent-3) optogenetics

Intervent-4) lesions

Intervent-5) pharmacological treatments

A maximum of two "neuro-intervention" techniques will be used in a single animal. In the vast majority of cases only a single intervention technique is used in a single animal.

These techniques allow interventions of both local and global processes, with different levels of spatial, cellular and pharmacological selectivity. We need such an array of intervention techniques to increase the chance that we can identify the neurobiological underpinnings of the behavior studied and find ways to alter compulsive behavior.

Below the general organization of the experiments is outlined. We've chosen a selected number of compulsivity models, component behaviors and measurement techniques that will be the first focus of our attention. The remaining (second tier) models, components and techniques will later be used to extend findings and solve questions that are still unanswered after the first tier of experiments.

The general organization is:

A) to establish and validate the intervention techniques in animal models for compulsive behavior – in pilot experiments a satisfactory paradigm is selected for further use (in 3.4.4.1);

B) to alter the compulsive behavior in the animal models –will deliver data of efficacy potential of target structures and/or cellular processes.

C) to establish and validate the intervention techniques when components of compulsive behavior are studied in animal models of compulsive behavior – in pilot experiments a satisfactory paradigm is selected for further studies.

D) to alter behavior in the animal models while they are engaged in one of the components – will deliver efficacy potential data of target structures and/or cellular processes.

All neuro-intervention techniques will require intracranial (technical) implants mounted to the skull of the animals with screws and dental cement (Intervent-1,-2,-3, and -5). Exceptions are Intervent-4, where a one-off local microinjection is performed. In Intervent-2 and Intervent-5 pharmacological agents can be administered peripherally or centrally through the implanted cannula.

Intervent-1 and Intervent-3 involve continuous application of electrical or light pulses and therefore require tethering of the animals from their cement head caps (implants differ slightly depending on the technique) to commutators (connected with technical equipment) to allow animals to move freely during the behavioral assays.

---

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

Neuro-interventions are carried out in animal models of compulsivity and their controls. We'll start with our three first tier models (Sapap3-mutant mice, quinpirole-treated rats and cocaine self-administering rats) and combine these with 3 intervention techniques (deep brain stimulation, optogenetics, pharmacogenetics).

This procedure can consist of the following steps (including steps described in 3.4.4.1, see below):

1. Animals are housed together until they become at least young adults (6-8 weeks of age). Then they are handled and weighed every week.
2. In case of pharmacogenetics (Intervent-2) and optogenetics (Intervent-3), viruses that will express proteins that will make infected neurons sensitive to pharmacological or optical treatment, are infused intracranially. If possible, in the same surgical session, intervention devices are implanted into the animals' brains through holes that are drilled into the skull (under adequate anaesthesia and analgesia). Depending on the technique, the equipment consists of electrodes (Intervent-1), a guide cannula to enable the infusion of pharmacological agents (Intervent-2,-4, and -5), or fiber optics (Intervent-3).
3. Animals will acutely recover from anaesthesia in their home cages on a heating plate. Subsequently, long-term recovery from surgery will last one week, in which the animals will not undergo any additional experimental procedures causing discomfort.
4. Training in a model for compulsive behavior and/or its components.
5. Application of "Neuro-intervention" techniques to alter behavior in awake rodents behaving in paradigms listed below.

Procedures Intervent-1 and -3:

After transport from the housing room to the experimental room, animals will be habituated to the room

---

for one hour. Then animals will be introduced to the testing environment and connected to the intervention set-up. In some cases, the head-implanted equipment (if present) is connected to the recording set-up by a cable that runs through an optical (C) or electrical (A) commutator (swivel) mounted above them, allowing free movement in the experimental cage. In other cases, a commutator is not required (D and E) or a wireless device is used (A). After neuro-intervention during behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be disconnected, removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately 2-7 h [test 1-6 hours + ~1 hour for connecting and disconnecting the animals]. [frequency: up to one times daily, for the entire length of a behavioral paradigm (see 3.4.4.1) – up to maximally 3 months in some cases]

At the end of the experiment, the animals will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, histology, and immunohistochemistry. In case of DBS (A), a weak current is applied prior to perfusion to the stimulating electrode for up to 30 seconds to mark the position of the electrodes with a small electrolytic lesion under proper isoflurane anaesthesia (no discomfort for the animal).

#### Procedures Intervent-2 and -5:

After transport from the housing room to the experimental room, animals will be habituated to the room for one hour. On some days, animals will be infused intracranially with pharmacological agents by introducing an infusion cannula into the previously implanted guide cannula. Subsequently, the animals are introduced to the testing environment. After neuro-intervention during behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately 2-7 h [test 1-6 hours + ~1 hour for infusing the animals and letting the intervention drug act]. [frequency: up to one times daily, for the entire length of a behavioral paradigm (see 3.4.4.1) – up to maximally 3 months in some cases]

At the end of the experiment, the animals will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, histology, and immunohistochemistry.

#### Procedure Intervent-4:

After transport from the housing room to the experimental room, animals will be habituated to the room for one hour. Subsequently, the animals are introduced to the testing environment. After behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately test 1-6 hours. [frequency: up to one times daily, for the entire length of a behavioral paradigm (see 3.4.4.1) – up to maximally 3 months in some cases]

At the end of the experiment, the animals will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, histology, and immunohistochemistry.

Sequence of experiments. Most of the models of compulsivity and also most of the components need acquisition/treatment periods of several weeks. The optimal sequence of events may vary: in some cases the sequence may be implantation, measurement during compulsivity acquisition and expression; in other cases the sequence compulsivity acquisition, implantation, measurement during component acquisition (habit, flexibility, fear conditioning) might be preferred or, alternatively, component (chronic stress or enrichment), implantation, compulsivity acquisition. The most suitable sequence (in terms of measurement success and animal discomfort) will be selected in pilot experiments in C).

#### First tier **models of compulsivity (text identical to 3.4.4.1 is indicated in italics).**

1. *Sapap3-mutant mice* are tested for spontaneous compulsive grooming behavior by introduction in a relatively large open field, where they are left for approximately 30-90 min. Grooming behavior generally increases when the animals get older and testing is repeated with approximately a monthly frequency. Animals are regularly (first weekly, when bare spots of skin develop, daily) monitored. They are removed from the experiment and euthanized when discomfort exceeds moderate. *Sapap3-mutants* are an example of the group of genetic compulsivity models - all showing increased grooming behavior. Other genetically manipulated lines may be added to or replace the *Sapap3* mice in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available.

Observation period: up to 10 months. Observation test: once monthly for 1-2 h.

2. *Quinpirole-treated animals* are treated with quinpirole on a daily or twice weekly basis. After the administration they are placed in an open field, T-maze or other environment that they can explore. Compulsive behavior is maximal after 10-15 injections and may remain present for one to several weeks.

Compulsive behavior is tested by observation of checking the open field, or making choices for reward collection in the T-maze (for this, animals need to be food-restricted and kept at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight). Quinpirole-treated rats present an example of the group of pharmacological compulsivity models – all depending on 1-3 weeks of drug administration and showing stereotyped or ritualized behaviors. Other models may be added to or replace the quinpirole-treated rats (after consultation of the IvD), in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Quinpirole administration: 2-6 weeks; testing 2-4 weeks; total 1-3 months.

An alternative version of this procedure is to combine the quinpirole administration with an operant procedure in which chronic quinpirole also increases checking behavior. Rats are kept at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight.

Operant training: 2-4 weeks; quinpirole administration with continued training: 2 weeks; testing: 2-4 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

3. Cocaine (or other drugs of abuse) self-administration requires the placement of an intravenous catheter (under adequate anesthesia and analgesia) for delivery of the drug. Following this, they are housed separately. After a recovery period of at least one week, the animals will be allowed to self-administer drugs of abuse through this catheter over a period of up to 3 months. Blood samples will subsequently be collected at different time intervals (less than 10 times during 48 hours) using the cannulas to determine the concentration of the substance and the expression of biomarkers. The final phase includes responding for cocaine when additionally a foot shock is delivered. In the course of the training, a period of abstinence is included, which will lead to mild to moderate discomfort in the case of cocaine and moderate discomfort when heroin is used. Cocaine self-administering rats present an example of the group of addiction compulsivity models, all showing escalating self-administration and progression to validated compulsive behavior. Other models (e.g. heroin self-administration) may be added to or replace the cocaine rats in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Surgery 1-2 weeks; daily training: 3 months; testing: 1 week; total: up to a maximum of 6 months.

Second tier models of compulsivity.

4. Repeated optogenetic stimulation of the brain (e.g., medial orbitofrontal cortex) has been described in mice, but would also be applicable in rats. This involves stereotactic microinfusion of AAV in the medial orbitofrontal cortex to express light-sensitive proteins and placement of an optic fiber in the same area or in the medial striatum (under adequate anesthesia and analgesia). After a recovery period of at least three weeks, the animal is once daily stimulated while in an open field. Repeated stimulation leads to increased grooming, which is recorded 1 h after the stimulation. After withholding stimulation, grooming is increased for another two weeks.

Surgery and virus expression: 3-4 weeks; daily stimulation and testing: 1-2 weeks; further testing 1-2 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

5. Schedule-induced polydipsia is induced when rats are trained in an operant box (maintained at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight) under a reinforcement schedule, where pellets are delivered into the experimental apparatus approximately every minute. Due to this frequent, spaced out delivery of small amounts of food, a proportion of the animals strongly increase their water intake (a water bottle is present in the experimental apparatus)

Daily training & testing: up to a maximum of 3 months.

6. Signal attenuation is tested when rats or mice (maintained at  $85\pm 5\%$  of their free feeding weight) first learn to associate reward delivery with a cue (signal) and are then exposed to the signal in the absence of reward delivery. In the final test, this group shows more irrelevant responses than a regular extinction group. Daily training 1-4 weeks; testing 1 week; total: up to a maximum of 3 months.

**In the majority of cases, only a single model of compulsivity (see 1.-6. above) will be used in a single animal. In a minority of cases, a maximum of two of the six models listed above will be used in a single animal (e.g., optogenetic generation of compulsivity in SAPAP3 mice).**

Components of compulsivity.

1. Anxiety testing. In behavioral tests for anxiety, the animals' general anxiety is tested by measuring their avoidance of the center of an open-field box or the amount of time spent away from exposed parts of an elevated plus maze. This is a short, acute test which may be repeated e.g. throughout the life of a

*Sapap3-mutant, or before and after development of cocaine- or quinpirole-related compulsive behavior. No training. Test < 1 day, repeated 2-3x over a maximum of 2-6 months.*

2. Habit formation. *Food restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained in rewarded operant tasks favoring either habitual or goal-directed behavior and tested following pre-exposure to the rewards or by induction of taste aversion by pairing the reward with e.g. lithium chloride. Alternatively, habitual or goal-directed avoidance behavior (responding to avoid a mild foot-shock) may be acquired and tested by pre-exposure to punishments (e.g., mild shock). Daily training: 1-3 months; test up to 8 days.*

3. Cognitive flexibility. *Food-restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained to make choices in operant tasks (in operant boxes or on cross- or T-mazes) and are exposed to a novel situation during the test. Depending on the level of flexibility tested, daily training continues for 2 weeks to 3 months and flexibility can be tested in one day at several stages during acquisition. Signal attenuation holds an intermediate position between models for compulsivity and a component of compulsivity and may be applied as a flexibility test in models of compulsivity as well.*

4.a. Repeated stress exposure. *Animals undergo repeated/chronic stress (e.g. social defeat, restraint, forced swimming, corticosterone administration) or repeated injections of stress hormones. Daily exposure to one of the stressors. Total: 2-4 weeks*

*To assess the effect of stress exposure and corticosterone administration, plasma samples will be taken in some animals after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.*

4.b. Chronic environmental enrichment. *Animals undergo repeated/chronic exposure to positive stimuli by continuously altering environmental enrichment of the home cage. Exposure is continuous, with daily environmental alterations. Total: 1 month*

*To assess the effect of enrichment, plasma samples will be taken after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.*

4.c. Acute stress exposure. *Animals will be exposed to restraint, foot-shocks, TMT-odor (fox urine), or social defeat. Exposure depending on the stressor type maximally 1,5 h, once, immediately before a compulsivity or other test.*

5. Fear conditioning. *Animals are exposed to foot shocks paired with environmental cues. Punishments include mild electrical foot shocks (delivered in an automated behavioral testing system (operant box)). Outcome measures are for example cue-induced freezing. Daily training: up to 1 week; test: 1-2 days. Potentially repeated 2 times over a maximum of 2-6 months.*

***In the majority of cases, models (above, 1. through 6.) and components (above, 1. through 5.) will be tested for 3 months at the maximum. However, on average tests will be substantially shorter. On the other hand, in a few cases the maximum 3 months will be exceeded: Up to three behavioral tests will be combined in such cases (3 x 3 months or 3 + 6 months = 9 months). Absolute maximum duration of such test combinations is thus 9 months.***

*The duration of all procedures described in appendices 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4 are fully determined by what is outlined in 3.4.4.1, with the addition that measurements and interventions are conducted in this time period.*

*A lot of the components need to be tested in combination with different compulsivity models in order to identify which components are most influential. However, there are a number of combinations and experimental scenarios that are not going to be employed by us, because they are not useful in targeting the questions that we are trying to investigate. In general, compulsivity models will be used in combination with a maximum of three compulsivity component tests. In no case/scenario will the cumulative discomfort exceed moderate levels (i.e., component testing will always be temporally separated).*

*Not going to be used:*

- fMRI scanning of mice (SAPAP3 or any other mice)*
- fear conditioning (component 5) and stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c))*
- fear conditioning (component 5) and quinpirole (model 2)*

- fear conditioning (component 5) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- signal attenuation (model 6) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c)) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)

Testing of females. When we use female animals, estrous cycle will be checked frequently to control for potential sex hormonal effects on behavior and to determine when to conduct crucial parts of the experiments. A small subset of female animals (under proper anesthesia and perioperative analgesia) is ovariectomized to control for variability due to estrous cycle. Surgery and recovery: 1 week.

At the end of the experiment, all animals will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry, and histology. The brains will be collected for histology and immunohistochemistry (e.g., stains to confirm the localization of the electrodes or cannulae, or stains to assess the effects of electrode stimulation). In the case of virus injections the expression of the light- or drug-sensitive proteins will be visualized.

As all animals are implanted with electrodes, equipped with head posts etc. and have been through long behavioral procedures, they are not available for re-use in any protocol involving behavior.

---

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

Pilot experiments: Establishing new or adapted behavioral procedures requires step-by-step introduction and adaptation on the basis of obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Qualitative analysis: when experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on the pilots and on literature data.

Quantitative analysis: when experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant – all of which will be communicated to and checked by the IvD.

---

## **B. The animals**

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

Species used:

*Mice (mus musculus): genetically modified and wild type; mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats (rattus norvegicus): genetically modified and wild type; rats are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats and mice are the best investigated mammal species used for fundamental research with significant knowledge about the anatomy and physiology of the rodent brain. The latest, most sophisticated technologies for investigating brain mechanisms are made for use in these species, including a variety of genetically engineered strains. It is required to use both strains because each strain offers specific advantages. Rats exhibit a greater spectrum of complex behaviors that are essential for assessing compulsive behavior and its components (and some genetic tools are available for rats). In addition, measurement techniques are more widely available and more easily applicable in rats.*

*In contrast, many genetic tools are available for the manipulation of neuronal activity in mice (but mice exhibit a narrower spectrum of complex behaviors). The use of mice in addition to rats is mainly based on the availability of transgenic mice showing increased spontaneous grooming (no additional pharmacological treatment or behavioral training is required), such as the Sapap3-mutant mouse, which has been validated as an animal model for obsessive-compulsive disorder. Another factor is the possibility to study individual differences, where e.g. the fact that we breed transgenic mice (such as Sapap3-mutants) ourselves provides a natural opportunity to study individual differences.*

Sex used: We aim for efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-

---



house. In most other cases, males are used as they present the standard sex in the literature and almost all reference protocols and publications are based on the use of male rodents. Up to now, the overwhelming majority of behavioral and physiological studies on compulsivity in animals was carried out in male rodents. However, sex differences in clinical compulsivity have been reported. We plan to evaluate the experience of studying sex differences and decide if using female rodents in other parts of this project would be of scientific value. Since we aim for an efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house, in some cases both males and females are used in the same experiment. In case sex differences become focus of an experiment, it is necessary to use males and females in the same conditions and during the same time period to be able to properly compare them.

**Animal number:** All animals will be young adults or adult at the start of the experiments. The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years with the introduction of new paradigms and techniques. Thus, there are some factors involved that cannot be determined precisely. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Neuro-intervention studies (3.4.4.3) contain an average of 20 animals (experimental group plus controls) plus 2 extra rats or mice for each experimental group and control groups, compared to the purely behavioral experiments of 3.4.4.1. This is to account for drop-out because of mis-placement and/or technical problems over the course of the experiments. Based on the present plans (most experiments will last about one month; 14 operant boxes for behavioral testing will be available for parallel use; behavioral test sessions last for about one hour; on average measurements and interventions are taking place on no more than a third of the overall experimental training days) we will use approximately 1050 animals in this appendix, 350 mice and 700 rats. All (100%) will be exposed to moderate discomfort.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Behavior is the important parameter measured in these experiments and the use of intact, awake animals to perform behavioral experiments is inevitable. Behavior is a complex phenomenon and the development of compulsive behavior cannot be modeled in cell cultures or lower animal species than mammals. For measurements of brain activity or for altering that activity during compulsive behavior an intact brain is needed, as well.

We have direct and intensive contact with psychiatrists who study compulsive behavior in patients and use the most advanced techniques to measure brain activity in humans. A continuous interaction with the clinicians ensures that we will always be informed of possible alternatives for animal research. However, the possibilities for invasive measurements in the human brain are restricted and the highly selective and sensitive techniques that we have available for measurement and stimulation of brain activity can as yet only be applied in (transgenic) animals. The basic testing of these intervention- and measurement-techniques will be performed as much as possible prior to performing an animal experiment.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. It is necessary to use both species because each of them offer specific advantages: Rats have a greater range of complex behaviors enabling better assessment of cognitive functions; more genetic tools and mutants are available for mice and one of our most important animal models is a mutant mouse strain.

We will use both male and female rats and mice in the case of the (transgenic) animals that are bred in

house, this will lead to a reduction of “breeding surplus”.

Although most of our experiments critically require behavioral naive animals, we will transfer animals to 3.4.4.5 (for further non-behavioral experimentation) whenever possible. This is not possible with animals that have intracranial implants (all of the animals in 3.4.4.2/3/4).

The intervention techniques that will be most frequently used (deep brain stimulation and optogenetics) allow repeated interventions and interventions using a wide range of different parameters in each animal. Thus, we will strive to perform experiments where each animal is his/her own control if possible (e.g. stimulation on vs stimulation off – stimulation A vs stimulation B etc; this is also the way in which the clinical experiments are performed). In general, this also increases power and decreases the number of animals required.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. All novel behavioral paradigms and measurement and intervention technique will first be introduced in control animals in small, pilot groups and only be used in full experiments when the procedure is validated. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the maximum number of animals needed to obtain interpretable data.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and clearly defined humane endpoints applied. Animals will be allowed to recover from surgery for one week. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Mice will be handled using the tube method (Hurst & West, 2010) if possible, this reduces stress resulting from interactions with the experimenter.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

Rats and mice will be socially housed if possible (unless implanted with a device, in that case animals are single-housed because they would damage each other’s implants) and provided with environmental enrichment. Furthermore, animals will be handled starting up to 2 weeks before start of the experiments and they will be habituated to the experimental setup several times before testing.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

In most cases, such as after implantation of optic fibers, intravenous catheters etc., animals will be housed solitary. This is done because otherwise cage mates will damage these implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. We will limit the single housing in the duration to the minimum period necessary. In some cases, food restriction needs to be combined with isolated housing, when socially housed

animals do not receive the amounts of the food needed to maintain their body weight at  $85 \pm 5\%$  of their free feeding weight. The re-introduction of animals to established groups will be carefully monitored to avoid problems of incompatibility and disrupted social relationships.

#### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

#### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or simulate chronic stress). All other procedures (67%) do either not produce pain or pain when is experienced, analgesia is provided (e.g., in surgical interventions adequate analgesia will be used).

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

Proper anesthesia and analgesia is used for all procedures that are not related to experimental testing (see above under "No"), which is primarily surgery.

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

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

1. Sapap3-mutant mice show increased grooming, which by itself brings no additional discomfort, but may lead to bare spots of skin and finally to skin lesions, and maximally moderate discomfort.
2. Quinpirole injections leads to a certain period (up to 1 h) of disturbed behavior and sometimes signs of increased anxiety, associated with maximally moderate discomfort.
3. It is difficult to estimate if animals experience discomfort when they develop compulsive behavior. We estimate that by itself, Increased grooming or increased operant responding does not lead to discomfort.
4. Animals addicted to cocaine or heroin do not seem to experience discomfort as long as they are able to obtain the drug. During extinction tests, animals will experience discomfort because of withdrawal symptoms. The severity varies for different drugs: cocaine abstinence is estimated as causing mild to moderate discomfort, heroin abstinence as moderate discomfort. Discomfort is highest on the first day and becomes less on subsequent days.
5. In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or induce chronic stress). Animals tested for levels of compulsivity or fear conditioning will experience repeated foot-shocks in daily sessions for 1-2 weeks, leading to no more than moderate discomfort. Animals tested for the effects of stress-induced aggravation of compulsivity will experience increased stress from daily exposure to one of several stressors for the duration (2-4 weeks) of the exposure, leading to moderate discomfort.
6. Food restriction to  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight leads to initial mild discomfort, which decreases or disappears upon habituation during further training and testing.

7. Chronic stress-exposed animals with catheters for plasma sampling need to be handled leading to repeated mild discomfort.
8. Recovery from stereotactic surgery and implantation of catheters may lead to maximally moderate discomfort.
9. Handling animals to connect implanted electrodes etc to measurement equipment and, following behavioral and measurement sessions, disconnect them leads to repeated mild discomfort.
10. Neuro-intervention is used to induce behavioral changes. While the aim is to reduce compulsive (pathological) behavior, it cannot be completely avoided that we may also sometimes induce unwanted behavior. In the pilot experiments we will carefully select the parameters for DBS and optogenetic stimulation, the targets for lesions, local microinfusions of pharmacological agents so that no extra discomfort is caused when the formal experiments are performed.
11. Other aspects that may compromise the welfare of the animals are:
  - Unforeseen surgical complications, such as excessive bleeding, adverse reactions to the applied anaesthetic, or accidental severing of nerve fibers or blood vessels.
  - Inflammation in the tissue around implanted devices such as intravenous catheters.
  - During intravenous drug self-administration animals sometimes overdose.

Damage or loss of the head-stage/connector on the skull may lead to moderate discomfort. Animals will be taken out of the experiments when this happens.

Explain why these effects may emerge.

Mild to moderate discomfort in the above examples 1-7 and 9 and 10 are inherent to the models of compulsivity and to the measurement or intervention techniques, while example 8 is inherent to surgical procedures.

Surgical procedures are subject to human error. These procedures cannot be executed with 0% failure rate and very seldomly increased postoperative bleeding leads to maximally moderate discomfort.

There is considerable variability within rodent populations regarding the sensitivity to anaesthetics and drugs.

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

Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD or veterinary officer. Possible treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

For intravenous drug self-administration a maximum number of drug infusions is programmed into the software controlling the infusion pump.

The intensity of foot-shocks is limited to the lowest effective combination of current strength and duration. Foot-shock intensity will never exceed 1 mA.

If animals are on a food-restriction regimen, they are weighed each day and the amount of food given is adapted to keep the weight at  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight.

## **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The maximum degree of cumulative discomfort in any combination of tests/measurements/interventions will not exceed moderate discomfort. Animals will be euthanized with pentobarbital (applied by i.p. injection), if:

1. Persistent weight reduction (i.e., 20% or more compared to the weight at the experimental start in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals), or acute weight loss within 2 days (15% in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals) leading to more than moderate discomfort.
2. Abnormal behavior and/or posture, immobility, dirty fur, and other signs of distress, sickness, other unexpected circumstances leading to more than moderate discomfort.
3. Open wounds in Sapap3-mutant mice leading to more than moderate discomfort (10-20 % of older

(> 6 months) mice; almost none in younger Sapap3-mutants).

Indicate the likely incidence.

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

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Level of discomfort: Neuro-intervention studies (as described here in 3.4.4.3 (and the behavioral aspect in 3.4.4.1)) last up to 3 months; up to 6 months when two are combined. In the majority of paradigms, we food-deprive the animals (mild discomfort). Exceptions are drug self-administration studies (also mild discomfort due to drug withdrawal and catheter implantation) and studies only looking at measures of anxiety (mild discomfort due to experiencing fear and anxiety; or pain due to foot shocks) and spontaneous behavior (no discomfort (if not implanted with a headcap)). Of the SAPAP3 mutant mice, up to 50% will experience mild discomfort due to small skin lesions inflicted by excessive grooming (phenotype); the other 50% will be used before this phenotype develops. In addition, most animals will receive head implants or intracranial injections during a stereotaxic surgery for the measurement of brain activity. The recovery of this surgery is deemed moderate discomfort (for one week). Following recovery, wearing a cement headcap and being tethered to a commutator frequently will induce mild discomfort. Thus, we estimate 100% of the animals to experience mild discomfort throughout the experiments, with a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries. A small percentage of rats (up to 10% will undergo head restraining several times, which induces moderate discomfort).

In total, we estimate that of the 350 mice, 350 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during training of head restraining (→ cumulative moderate).

Of the 700 rats, 700 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during head restraining (→ cumulative moderate).

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals will receive an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry and histology.

Subsequently, protein expression following virus injections, localization of implanted fibers and possible brain pathology in compulsivity models will be assessed.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Nederlands Herseninstituut - KNAW	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.4	<b>Establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation</b>

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### **The general research questions addressed in our project are:**

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

##### **The aim of the procedures described in this appendix (3.4.4.4) is to answer the above questions 3, 4, and 5:**

- to identify neuroanatomical connections between brain regions involved in compulsive behavior (and its components) and to characterize how these brain regions interact with and regulate each other.

**Neuro-intervention and neuro-measurement in awake behaving animals (only reached in a relatively small number of animals):** Brain activity will be manipulated (excitation or inhibition) at the neuronal or network level using pharmacology, optogenetics, pharmacogenetics, deep-brain stimulation (DBS) or by performing lesions (see 3.4.4.2). These techniques can facilitate or disrupt the activity of a group of neurons in a local region (e.g., optogenetics), neurotransmitter systems or entire brain networks (e.g., DBS). Such interventions will allow us to establish causal relationships between behavior and neural correlates of interest, which is one of the key aims of this proposal. For these experiments, we will measure the difference in neuronal responses and behavior (simultaneously) between a baseline

time when the manipulation had not been performed and following this intervention. Measurements will be collected using neurobiological activity using calcium imaging, electrophysiology, electrochemistry, microdialysis, and fMRI (also see 3.4.4.3).

**The main outcome parameter of these procedures is neuronal activity, in combination with behavior.**

Thus, in these procedures "neuro-measurement" and "neuro-intervention" techniques described under 3.4.4.2 and 3.4.4.3, respectively, will be combined to study brain activity and interaction between brain systems in the awake behaving animal. Thus, in these procedures behavioral tests described under 3.4.4.1 will be combined with one of the following "neuro-measurement" techniques to measure brain activity in awake rodents in our lab (techniques previously described in **3.4.4.2**):

Measure-1) electrophysiology to assess neuronal firing and brain network activity  
Measure-2) electrochemistry to assess fast neurotransmitter release (e.g., fast-scan cyclic voltammetry)  
Measure-3) microdialysis to assess slow neurotransmitter release  
Measure-4) calcium imaging to assess neuronal ensemble activity  
Measure-5) functional magnetic resonance imaging (fMRI) to assess whole-brain activity.

"Neuro-intervention" techniques to measure brain activity in awake rodents in our lab (techniques previously described in **3.4.4.3**) are:

Intervent-1) Deep-brain stimulation (DBS)  
Intervent-2) pharmacogenetics  
Intervent-3) optogenetics  
Intervent-4) lesions  
Intervent-5) pharmacological treatments

One "neuro-measurement" technique will be combined with one "neuro-intervention" technique.

Both neuronal activity and neurotransmitter release are studied and measurements focus on both local and global processes. We need such an array of measurement and intervention techniques to increase the chance that we can identify the neurobiological correlates of the behavior studied and thus find targets for subsequent (3.4.4.3) intervention experiments.

Below the general organization of the experiments is outlined. We've chosen a selected number of compulsivity models, component behaviors and measurement techniques that will be the first focus of our attention. The remaining (second tier) models, components and techniques will later be used to extend findings and solve questions that are still unanswered after the first tier of experiments.

The general organization is:

A) to establish and validate the combination of measurement and intervention techniques in animal models for compulsive behavior – in pilot experiments the first steps are taken, until a satisfactory solution is obtained.

B) to measure the neuronal activity parameter in the behaving individuals of animal models for compulsive behavior in response to neuro-intervention – will deliver data of neuronal activity during compulsive behavior.

C) to establish and validate the combination of measurement and intervention techniques when components of compulsive behavior are studied in animal models of compulsive behavior – in pilot experiments the first steps are taken, until a satisfactory solution is obtained.

D) to measure and manipulate neuronal activity parameters in the animal models and controls while they are engaged in one of the components – will deliver data of neuronal activity during habit formation etc. in compulsive animals.

All neuro-measurement techniques (3.4.4.2) will require intracranial (technical) implants mounted to the skull of the animals with screws and dental cement. Techniques Measurement-1 to -4 require tethering of the animals from their cement head caps (implants differ slightly depending on the technique) to commutators (connected with technical equipment) to allow animals to move freely during the behavioral assays.

Measurement-5 (and in some cases measurement-4) requires head re-straining because movement artefacts will otherwise prevent measurements. Pilot experiments (C) to combine conditioning tests (both appetitive and aversive) with fMRI measurements will be initiated and should lead to formal experiments under D.

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

Neuro-measurements and neuro-interventions are carried out in animal models of compulsivity and their controls. We'll start with our three first tier models (Sapap3-mutant mice, quinpirole-treated rats and cocaine self-administering rats) and combine these with 3 measurement techniques (electrophysiology, fast-scan cyclic voltammetry and fMRI) and a selection of intervention techniques (see above).

Electrophysiology and voltammetry will be used in all 3 models, but fMRI will be restricted to rats in the cocaine self-administration and quinpirole models.

When such measurements are combined with components of compulsivity the standard is to test anxiety and one other component (i.e., either habit formation, cognitive flexibility, sensitivity to stress, or fear conditioning). We'll first focus on habit formation, later on cognitive flexibility.

This procedure can consist of the following steps:

1. All animals (wildtype or genetically manipulated) are housed together in single-sex groups until they become at least young adults (8 weeks of age). Two weeks before the start of behavioral experiments animals will be handled and weighed frequently.
2. Measurement and intervention equipment is implanted into the animals' brains through holes that are drilled into the skull (under adequate anesthesia and analgesia). In case of calcium imaging (measurement-4), a virus that will express Ca-indicating proteins, is infused (under adequate anesthesia and analgesia; at least 3-4 weeks recovery from this surgery to allow the virus to express). Animals will recover from anesthesia for at least one week. Depending on the technique, the equipment consists of electrodes (Measurement-1 and measurement-2), a guide cannula to enable lowering of electrodes (measurement-2) or a semipermeable membrane (measurement-3), fiber optics (measurement-4), or a post for head fixation (measurement-4 and measurement-5). In case of calcium imaging (measurement-4), a virus that will express proteins that make calcium fluorescent and thus optically detectable, is infused. During the same surgery, intervention devices are implanted into the animals' brains. Depending on the technique, the equipment consists of electrodes (intervention-1), a guide cannula to enable the infusion of pharmacological agents (intervention-2, intervention-4, and intervention-5), or fiber optics (intervention-3). In case of pharmacogenetics (intervention-2) and optogenetics (intervention-3), a virus that will express proteins that will make infected neurons sensitive to pharmacological (e.g., clozapine-N-oxide) or optical (e.g., light manipulating so-called opsins) treatment, is infused.
3. Measurements and interventions in a model for compulsive behavior (group B) or compulsive behavior *and* its components (group D). Pilot experiments in groups A and C are used to establish the optimal sequence and timing of events.

The measurement and intervention procedures can consist of the following steps (including steps described in 3.4.4.1, see below):

Measurement-1 to -4 (electrophysiology, voltammetry, microdialysis, Ca-imaging):

After the animals are connected to the recording/measuring set-up, they can move freely in the test box or test maze. The total time in the test will vary between 2-9 h. Daily electrophysiology and voltammetry measurements can continue for up to 3 months. Microdialysis measurements can be repeated once. Ca-imaging can be repeated. Pilot experiments will be needed to establish the frequency and maximum number of measurements.

Measurement-4 or -5 (Ca- & fMRI-imaging):

Scanning animals in a MRI scanner (and in some cases calcium imaging) requires head restraining to minimize head-movement-induced artefacts in the measurements. We follow a training protocol of 5 consecutive days with a duration of up to one hour each which reduces stress responses (corticosterone levels and observed restrained behavior). Non-coping animals will be removed from the experiment.

After restraint training sessions concluded, animals will be transported to the MRI scanner (or calcium imaging apparatus). There the animals will be placed inside the scanner bore in our restrainer device, which has room for a custom build head coil specifically designed for rodents (and room for connecting the calcium imaging equipment).

Training duration: 1-2 weeks. Both Ca- and fMRI imaging may be repeated. Pilot experiments will be needed to establish the frequency and maximum number of measurements.

Intervention-1 or -3 (DBS & optogenetics):

After transport from the housing room to the experimental room, animals will be habituated to the room for one hour. Then animals will be introduced to the testing environment and connected to the intervention set-up. In some cases, the head-implanted equipment (if present) is connected to the



recording set-up by a cable that runs through an optical (intervention-3) or electrical (intervention-1) commutator (swivel) mounted above them, allowing free movement in the experimental cage. In other cases, a commutator is not required (intervention-4 and -5) or a wireless device is used (intervention-1). After neuro-intervention during behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be disconnected, removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately 2-7 h [test 1-6 hours + ~1 hour for connecting and disconnecting the animals].

Intervention-2 or -5 (pharmacogenetics & pharmacological treatments):

After transport from the housing room to the experimental room, animals will be habituated to the room for one hour. On some days, animals will be infused intracranially with pharmacological agents by introducing an infusion cannula into the previously implanted guide cannula. Subsequently, the animals are introduced to the testing environment. After neuro-intervention during behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately 2-7 h [test 1-6 hours + ~1 hour for infusing the animals and letting the intervention drug act].

Intervention-4 (lesions):

After transport from the housing room to the experimental room, animals (with excitotoxic lesions of specific brain regions of interest) will be habituated to the room for one hour. Subsequently, the animals are introduced to the testing environment. After behavioral testing [duration: 1-6 hours; see 3.4.4.1], the animals will be removed from the testing environment, returned to their home cages, and transported back to the housing room. In total, one session will take approximately test 1-6 hours. [frequency: up to one times daily, for the entire length of a behavioral paradigm (see 3.4.4.1) – up to 3 months]

Sequence of experiments. Most of the models of compulsivity and also most of the components need acquisition/treatment periods of several weeks. The optimal sequence of events (compulsivity acquisition, intracranial implantation and measurements, acquisition of components) may vary: in group B the sequence may be implantation, measurement during compulsivity acquisition and expression; in group D: compulsivity acquisition, implantation, measurement during component acquisition (habit, flexibility, fear conditioning) or, alternatively, component (chronic stress or enrichment), implantation, compulsivity acquisition. The most suitable sequence (in terms of measurement success and animal discomfort) will be selected in pilot experiments in C).

First tier **models of compulsivity (text identical to 3.4.4.1 is indicated in italics).**

*1. Sapap3-mutant mice are tested for spontaneous compulsive grooming behavior by introduction in a relatively large open field, where they are left for approximately 30-90 min. Grooming behavior generally increases when the animals get older and testing is repeated with approximately a monthly frequency. Animals are regularly (first weekly, when bare spots of skin develop, daily) monitored. They are removed from the experiment and euthanized when discomfort exceeds moderate. Sapap3-mutants are an example of the group of genetic compulsivity models - all showing increased grooming behavior. Other genetically manipulated lines may be added to or replace the Sapap3 mice in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available.*

*Observation period: up to 10 months. Observation test: once monthly for 1-2 h.*

*2. Quinpirole-treated animals are treated with quinpirole on a daily or twice weekly basis. After the administration they are placed in an open field, T-maze or other environment that they can explore. Compulsive behavior is maximal after 10-15 injections and may remain present for one to several weeks. Compulsive behavior is tested by observation of checking the open field, or making choices for reward collection in the T-maze (for this, animals need to be food-restricted and kept at 85±5% of their free feeding weight). Quinpirole-treated rats present an example of the group of pharmacological compulsivity models – all depending on 1-3 weeks of drug administration and showing stereotyped or ritualized behaviors. Other models may be added to or replace the quinpirole-treated rats (after consultation of the IvD), in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Quinpirole administration: 2-6 weeks; testing 2-4 weeks; total 1-3 months.*

*An alternative version of this procedure is to combine the quinpirole administration with an operant procedure in which chronic quinpirole also increases checking behavior. Rats are kept at 85±5% of their*

free feeding weight.

Operant training: 2-4 weeks; quinpirole administration with continued training: 2 weeks; testing: 2-4 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

3. Cocaine (or other drugs of abuse) self-administration requires the placement of an intravenous catheter (under adequate anesthesia and analgesia) for delivery of the drug. Following this, they are housed separately. After a recovery period of at least one week, the animals will be allowed to self-administer drugs of abuse through this catheter over a period of up to 3 months. Blood samples will subsequently be collected at different time intervals (less than 10 times during 48 hours) using the cannulas to determine the concentration of the substance and the expression of biomarkers. The final phase includes responding for cocaine when additionally a foot shock is delivered. In the course of the training, a period of abstinence is included, which will lead to mild to moderate discomfort in the case of cocaine and moderate discomfort when heroin is used. Cocaine self-administering rats present an example of the group of addiction compulsivity models, all showing escalating self-administration and progression to validated compulsive behavior. Other models (e.g. heroin self-administration) may be added to or replace the cocaine rats in case models of higher scientific relevance to our questions or with higher chances to result in more reproducible results are available. Surgery 1-2 weeks; daily training: 3 months; testing: 1 week; total: up to a maximum of 6 months.

Second tier models of compulsivity.

4. Repeated optogenetic stimulation of the brain (e.g., medial orbitofrontal cortex) has been described in mice, but would also be applicable in rats. This involves stereotactic microinfusion of AAV in the medial orbitofrontal cortex to express light-sensitive proteins and placement of an optic fiber in the same area or in the medial striatum (under adequate anesthesia and analgesia). After a recovery period of at least three weeks, the animal is once daily stimulated while in an open field. Repeated stimulation leads to increased grooming, which is recorded 1 h after the stimulation. After withholding stimulation, grooming is increased for another two weeks.

Surgery and virus expression: 3-4 weeks; daily stimulation and testing: 1-2 weeks; further testing 1-2 weeks; total: up to a maximum of 3 months.

5. Schedule-induced polydipsia is induced when rats are trained in an operant box (maintained at 85±5% of their free feeding weight) under a reinforcement schedule, where pellets are delivered into the experimental apparatus approximately every minute. Due to this frequent, spaced out delivery of small amounts of food, a proportion of the animals strongly increase their water intake (a water bottle is present in the experimental apparatus)

Daily training & testing: up to a maximum of 3 months.

6. Signal attenuation is tested when rats or mice (maintained at 85±5% of their free feeding weight) first learn to associate reward delivery with a cue (signal) and are then exposed to the signal in the absence of reward delivery. In the final test, this group shows more irrelevant responses than a regular extinction group. Daily training 1-4 weeks; testing 1 week; total: up to a maximum of 3 months.

**In the majority of cases, only a single model of compulsivity (see 1.-6. above) will be used in a single animal. In a minority of cases, a maximum of two of the six models listed above will be used in a single animal (e.g., optogenetic generation of compulsivity in SAPAP3 mice).**

Components of compulsivity.

1. Anxiety testing. In behavioral tests for anxiety, the animals' general anxiety is tested by measuring their avoidance of the center of an open-field box or the amount of time spent away from exposed parts of an elevated plus maze. This is a short, acute test which may be repeated e.g. throughout the life of a Sapap3-mutant, or before and after development of cocaine- or quinpirole-related compulsive behavior. No training. Test < 1 day, repeated 2-3x over a maximum of 2-6 months.

2. Habit formation. Food restricted animals (85±5% of their free feeding weight) are trained in rewarded operant tasks favoring either habitual or goal-directed behavior and tested following pre-exposure to the rewards or by induction of taste aversion by pairing the reward with e.g. lithium chloride. Alternatively, habitual or goal-directed avoidance behavior (responding to avoid a mild foot-shock) may be acquired and tested by pre-exposure to punishments (e.g., mild shock). Daily training: 1-3 months; test up to 8 days.

3. Cognitive flexibility. Food-restricted animals ( $85 \pm 5\%$  of their free feeding weight) are trained to make choices in operant tasks (in operant boxes or on cross- or T-mazes) and are exposed to a novel situation during the test. Depending on the level of flexibility tested, daily training continues for 2 weeks to 3 months and flexibility can be tested in one day at several stages during acquisition. Signal attenuation holds an intermediate position between models for compulsivity and a component of compulsivity and may be applied as a flexibility test in models of compulsivity as well.

4.a. Repeated stress exposure. Animals undergo repeated/chronic stress (e.g. social defeat, restraint, forced swimming, corticosterone administration) or repeated injections of stress hormones. Daily exposure to one of the stressors. Total: 2-4 weeks

To assess the effect of stress exposure and corticosterone administration, plasma samples will be taken in some animals after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.b. Chronic environmental enrichment. Animals undergo repeated/chronic exposure to positive stimuli by continuously altering environmental enrichment of the home cage. Exposure is continuous, with daily environmental alterations. Total: 1 month

To assess the effect of enrichment, plasma samples will be taken after implantation of permanent cannulas into the jugular vein of adult animals (under adequate anesthesia and analgesia). Subsequently, animals will be housed individually.

4.c. Acute stress exposure. Animals will be exposed to restraint, foot-shocks, TMT-odor (fox urine), or social defeat. Exposure depending on the stressor type maximally 1,5 h, once, immediately before a compulsivity or other test.

5. Fear conditioning. Animals are exposed to foot shocks paired with environmental cues. Punishments include mild electrical foot shocks (delivered in an automated behavioral testing system (operant box)). Outcome measures are for example cue-induced freezing. Daily training: up to 1 week; test: 1-2 days. Potentially repeated 2 times over a maximum of 2-6 months.

**In the majority of cases, models (above, 1. through 6.) and components (above, 1. through 5.) will be tested for 3 months at the maximum. However, on average tests will be substantially shorter. On the other hand, in a few cases the maximum 3 months will be exceeded: Up to three behavioral tests will be combined in such cases (3 x 3 months or 3 + 6 months = 9 months). Absolute maximum duration of such test combinations is thus 9 months.**

The duration of all procedures described in appendices 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4 are fully determined by what is outlined in 3.4.4.1, with the addition that measurements and interventions are conducted in this time period.

A lot of the components need to be tested in combination with different compulsivity models in order to identify which components are most influential. However, there are a number of combinations and experimental scenarios that are not going to be employed by us, because they are not useful in targeting the questions that we are trying to investigate. In general, compulsivity models will be used in combination with a maximum of three compulsivity component tests. In no case/scenario will the cumulative discomfort exceed moderate levels (i.e., component testing will always be temporally separated).

Not going to be used:

- fMRI scanning of mice (SAPAP3 or any other mice)
- fear conditioning (component 5) and stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c))
- fear conditioning (component 5) and quinpirole (model 2)
- fear conditioning (component 5) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- signal attenuation (model 6) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)
- stress exposure/environmental enrichment (component 4 (a,b,c)) and optogenetic-induced compulsivity (model 2)

Testing of females. When we use female animals, estrous cycle will be checked frequently to control for potential sex hormonal effects on behavior and to determine when to conduct crucial parts of the experiments. A small subset of female animals (under proper anesthesia and perioperative analgesia) is ovariectomized to control for variability due to estrous cycle. Surgery and recovery: 1 week.

*At the end of the experiment, animals with catheters, intracranial virus injections, repeated quinpirole treatments, chronic stress exposure and all Sapap3-mutant mice will be given an overdose of Nembutal and perfused for brain fixation, immunohistochemistry, and histology.*

*After completion of the collection of data, the animals will be sacrificed (overdose of Nembutal and perfused for brain fixation) and their brains will be collected for histology and immunohistochemistry (e.g., stains to confirm the localization of the electrodes, or stains to assess the effects of electrode stimulation). In the case of electrophysiology and voltammetry a small electrolytic lesion under proper isoflurane anesthesia will precede the Nembutal treatment and perfusion.*

As all animals are implanted with electrodes, equipped with head posts etc. and have been through long behavioral procedures, they are not available for re-use in any protocol involving behavior.

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

Pilot experiments: Establishing new or adapted behavioral procedures requires step-by-step introduction and adaptation on the basis of obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Qualitative analysis: when experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on the pilots and on literature data.

Quantitative analysis: when experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

## **B. The animals**

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

### Species used:

*Mice (*mus musculus*): genetically modified and wild type; mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats (*rattus norvegicus*): genetically modified and wild type; rats are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats and mice are the best investigated mammal species used for fundamental research with significant knowledge about the anatomy and physiology of the rodent brain. The latest, most sophisticated technologies for investigating brain mechanisms are made for use in these species, including a variety of genetically engineered strains. It is required to use both strains because each strain offers specific advantages. Rats exhibit a greater spectrum of complex behaviors that are essential for assessing compulsive behavior and its components (and some genetic tools are available for rats). In addition, measurement techniques are more widely available and more easily applicable in rats.*

*In contrast, many genetic tools are available for the manipulation of neuronal activity in mice (but mice exhibit a narrower spectrum of complex behaviors). The use of mice in addition to rats is mainly based on the availability of transgenic mice showing increased spontaneous grooming (no additional pharmacological treatment or behavioral training is required), such as the Sapap3-mutant mouse, which has been validated as an animal model for obsessive-compulsive disorder. Another factor is the possibility to study individual differences, where e.g. the fact that we breed transgenic mice (such as Sapap3-mutants) ourselves provides a natural opportunity to study individual differences.*

Sex used: *We aim for efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house. In most other cases, males are used as they present the standard sex in the literature and almost all reference protocols and publications are based on the use of male rodents. Up to now, the overwhelming majority of behavioral and physiological studies on compulsivity in animals was carried out in male rodents. However, sex differences in clinical compulsivity have been reported. We plan to evaluate the experience of studying sex differences and decide if using female rodents in other parts of this project would be of scientific value. Since we aim for an efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house, in some cases both males and females are used in the same experiment. In case sex differences become focus of an experiment, it is necessary to use males and*

*females in the same conditions and during the same time period to be able to properly compare them.*

**Animal number:** All animals will be young adults or adult at the start of the experiments. The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years with the introduction of new paradigms and techniques. Thus, there are some factors involved that cannot be determined precisely. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Neuro-intervention/measurement studies (3.4.4.4) contain an average of 20 animals (experimental group plus controls) plus 2 extra rats or mice for each experimental group and control groups, compared to the purely behavioral experiments of 3.4.4.1. This is to account for drop-out because of mis-placement and/or technical problems over the course of the experiments. Based on the present plans (most experiments will last about one month; 14 operant boxes for behavioral testing will be available for parallel use; behavioral test sessions last for about one hour; on average measurements and interventions are taking place on no more than a third of the overall experimental training days) we will use 300 animals in this appendix, 150 mice and 150 rats. All (100%) will be exposed to moderate discomfort.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Behavior is the important parameter measured in these experiments and the use of intact, awake animals to perform behavioral experiments is inevitable. Behavior is a complex phenomenon and the development of compulsive behavior cannot be modeled in cell cultures or lower animal species than mammals. For measurements of brain activity or for altering that activity during compulsive behavior an intact brain is needed, as well.

We have direct and intensive contact with psychiatrists who study compulsive behavior in patients and use the most advanced techniques to measure brain activity in humans. A continuous interaction with the clinicians ensures that we will always be informed of possible alternatives for animal research. However, the possibilities for invasive measurements in the human brain are restricted and the highly selective and sensitive techniques that we have available for measurement and stimulation of brain activity can as yet only be applied in (transgenic) animals. The basic testing of these intervention- and measurement-techniques will be performed as much as possible prior to performing an animal experiment.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. It is necessary to use both species because each of them offer specific advantages: Rats have a greater range of complex behaviors enabling better assessment of cognitive functions; more genetic tools and mutants are available for mice and one of our most important animal models is a mutant mouse strain.

We will use both male and female rats and mice in the case of the (transgenic) animals that are bred in house, this will lead to a reduction of "breeding surplus". Although most of our experiments critically require behavioral naive animals, we will transfer animals to 3.4.4.5 (for further non-behavioral experimentation) whenever possible. This is not possible with animals that have intracranial implants (all of the animals in 3.4.4.2/3/4).

The measurement techniques that will be most frequently used (electrophysiology and fast-scan cyclic

voltammetry) have been developed to allow chronic recordings in each animal. Thus, we will strive to perform experiments where each animal is his/her own control if possible (e.g. stimulation on vs stimulation off – this is also the way in which the clinical experiments are performed). In general, this also increases power and decreases the number of animals required.

Ca-imaging will be carried out using fiber implants and the use of imaging windows requiring head fixation (and head fixation training) will be avoided as much as possible.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. All novel behavioral paradigms and measurement and intervention technique will first be introduced in control animals in small, pilot groups and only be used in full experiments when the procedure is validated. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the maximum number of animals needed to obtain interpretable data.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and clearly defined humane endpoints applied. Animals will be allowed to recover from surgery for one week. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Mice will be handled using the tube method (Hurst & West, 2010) if possible, this reduces stress resulting from interactions with the experimenter.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

Rats and mice will be socially housed if possible (unless implanted with a device, in that case animals are single-housed because they would damage each other's implants) and provided with environmental enrichment. Furthermore, animals will be handled starting up to 2 weeks before start of the experiments and they will be habituated to the experimental setup several times before testing.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

In all cases animals will be housed solitary. This is done because otherwise cage mates will damage these implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. We will limit the single housing in the duration to the minimum period necessary.

In some cases, food restriction needs to be combined with isolated housing, when socially housed animals do not receive the amounts of the food needed to maintain their body weight at  $85 \pm 5\%$  of their free feeding weight. The re-introduction of animals to established groups will be carefully monitored to avoid problems of incompatibility and disrupted social relationships.

**Check the answer given in procedure 3.4.4.1.**

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or simulate chronic stress). All other procedures (67%) do either not produce pain or pain when is experienced, analgesia is provided (e.g., in surgical interventions adequate analgesia will be used).

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

Proper anesthesia and analgesia is used for all procedures that are not related to experimental testing (see above under "No"), which is primarily surgery.

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

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

1. Sapap3-mutant mice show increased grooming, which by itself brings no additional discomfort, but may lead to bare spots of skin and finally to skin lesions, and maximally moderate discomfort.
2. Quinpirole injections leads to a certain period (up to 1 h) of disturbed behavior and sometimes signs of increased anxiety, associated with maximally moderate discomfort.
3. It is difficult to estimate if animals experience discomfort when they develop compulsive behavior. We estimate that by itself, increased grooming or increased operant responding does not lead to discomfort.
4. Animals addicted to cocaine or heroin do not seem to experience discomfort as long as they are able to obtain the drug. During extinction tests, animals will experience discomfort because of withdrawal symptoms. The severity varies for different drugs: cocaine abstinence is estimated as causing mild to moderate discomfort, heroin abstinence as moderate discomfort. Discomfort is highest on the first day and becomes less on subsequent days.
5. In a subset of animals (up to 33%) foot shocks will be applied. It is necessary that the animals experience these shocks in order for the behavioral tests to succeed (i.e., identify levels of compulsivity, fear/anxiety, or induce chronic stress). Animals tested for levels of compulsivity or fear conditioning will experience repeated foot-shocks in daily sessions for 1-2 weeks, leading to no more than moderate discomfort. Animals tested for the effects of stress-induced aggravation of compulsivity will experience increased stress from daily exposure to one of several stressors for the duration (2-4 weeks) of the exposure, leading to moderate discomfort.
6. Food restriction to  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight leads to initial mild discomfort, which decreases or disappears upon habituation during further training and testing.
7. Chronic stress-exposed animals with catheters for plasma sampling need to be handled leading to repeated mild discomfort.

8. Recovery from stereotactic surgery and implantation of catheters may lead to maximally moderate discomfort.
9. Handling animals to connect implanted electrodes etc. to measurement equipment and, following behavioral and measurement sessions, disconnect them leads to repeated mild discomfort.
10. Rats used for fMRI measurements will undergo restraint training, that will not exceed moderate discomfort. Rats showing signs of non-coping will be taken out of the experiment.
11. Other aspects that may compromise the welfare of the animals are:
  - Unforeseen surgical complications, such as excessive bleeding, adverse reactions to the applied anesthetic, or accidental severing of nerve fibers or blood vessels.
  - Inflammation in the tissue around implanted devices such as intravenous catheters.
  - During intravenous drug self-administration animals sometimes overdose.

Damage or loss of the head-stage/connector on the skull may lead to moderate discomfort. Animals will be taken out of the experiments when this happens.

Explain why these effects may emerge.

Mild to moderate discomfort in the above examples 1-7 are inherent to the models of compulsivity and to the measurement or intervention techniques, while example 7 is inherent to surgical procedures.

Surgical procedures are subject to human error. These procedures cannot be executed with 0% failure rate and seldomly increased postoperative bleeding leads to maximally moderate discomfort.

There is considerable variability within rodent populations regarding the sensitivity to anesthetics and drugs.

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

Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD or veterinary officer. Possible treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

For intravenous drug self-administration a maximum number of drug infusions is programmed into the software controlling the infusion pump.

The intensity of foot-shocks is limited to the lowest effective combination of current strength and duration. Foot-shock intensity will never exceed 1 mA.

If animals are on a food-restriction regimen, they are weighed each day and the amount of food given is adapted to keep the weight at  $85 \pm 5\%$  of free feeding weight.

Rats will be extensively handled and carefully trained for fMRI measurements. Rats that do not cope with the restraining training, will be taken out of the experiment. The restraining itself will be carried out under transient, light isoflurane anesthesia.

## J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The maximum degree of cumulative discomfort in any combination of tests/measurements/interventions will not exceed moderate discomfort. Animals will be euthanized with pentobarbital (applied by i.p. injection), if:

1. Persistent weight reduction (i.e., 20% or more compared to the weight at the experimental start in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals), or acute weight loss within 2 days (15% in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals) leading to more than moderate discomfort.
2. Abnormal behavior and/or posture, immobility, dirty fur, and other signs of distress, sickness, other unexpected circumstances leading to more than moderate discomfort.
3. Open wounds in Sapap3-mutant mice leading to more than moderate discomfort (10-20 % of older (> 6 months) mice; almost none in younger Sapap3-mutants).

Indicate the likely incidence.



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

---

**K. Classification of severity of procedures**

---

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

Level of discomfort: Neuro-intervention/measurement studies (as described here in 3.4.4.4 (and the behavioral aspect in 3.4.4.1)) last up to 3 months; up to 6 months when two are combined. In the majority of paradigms, we food-restrict the animals (mild discomfort). Exceptions are drug self-administration studies (also mild discomfort due to drug withdrawal and catheter implantation) and studies only looking at measures of anxiety (mild discomfort due to experiencing fear and anxiety; or pain due to foot shocks) and spontaneous behavior (no discomfort (if not implanted with a headcap)). Of the SAPAP3 mutant mice, up to 50% will experience mild discomfort due to small skin lesions inflicted by excessive grooming (phenotype); the other 50% will be used before this phenotype develops. In addition, most animals will receive head implants or intracranial injections during a stereotaxic surgery for the measurement of brain activity. The recovery of this surgery is deemed moderate discomfort (for one week). Following recovery, wearing a cement headcap and being tethered to a commutator frequently will induce mild discomfort. Thus, we estimate 100% of the animals to experience mild discomfort throughout the experiments, with a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries. A small percentage of rats (up to 10% will undergo head restraining several times, which induces moderate discomfort.

In total, we estimate that of the 150 mice, 150 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during head restraining.

Of the 150 rats, 150 will experience mild discomfort throughout the experiments and all of them will undergo a period of moderate discomfort for up to one week after stereotaxic surgeries or during head restraining.

---

**End of experiment**

---

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Rats and mice will be killed for histological and immunohistochemical analyses.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Nederlands Herseninstituut - KNAW	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number  3.4.4.5	Type of animal procedure  <b>Identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation</b>

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### **The general research questions addressed in our project are:**

1. How does compulsive behavior develop and is there a single or multiple form(s) of compulsivity?
2. What is the relation between compulsive behavior and its separate behavioral components?
3. How are compulsive behavior and its behavioral components encoded in the brain?
4. Which brain pathways are promising targets for therapeutic interventions such as brain stimulation?
5. What are the brain mechanisms of deep-brain stimulation (DBS) and what are the neuroanatomical connections of brain regions involved in compulsive behavior and its components?

##### **The aim of the procedures described in this appendix (3.4.4.5) is to answer the above questions 3 and 5:**

- to identify neuroanatomical connections between brain regions involved in compulsive behavior (and its components) and to characterize how these brain regions interact with and regulate each other.

##### **The main outcome parameter of these procedures is neuronal activity (in the anesthetized animals and in brain slices).**

Thus, in these procedures "neuro-measurement" and "neuro-intervention" techniques described under 3.4.4.2 and 3.4.4.3, respectively, will be combined to study brain activity and interaction between brain systems in anesthetized rodents or brain slices. Thus, this appendix is identical to 3.4.4.4 (also combines "neuro-measurement" and "neuro-intervention" techniques) except that it is carried out in an additional set of animals in the anesthetized preparation or in brain slices, so behavior is not taken into account. Furthermore, these experiments are conducted acutely, thus the procedures are non-survival. This acute approach enables the direct manipulation and measurement of brain circuits without the additional

complication of performing these techniques in behaving animals (needs no chronic implantation of tools into brain/skull and warrants less noisy recordings due to a better controlled environment and the absence of movement artefacts), and thus allows faster and more efficient testing of hypotheses regarding how brain regions of interest interact.

**Neuro-intervention and neuro-measurement in anesthetized animals:** Brain activity will be manipulated (excitation or inhibition) at the neuronal or network level using pharmacology, optogenetics, pharmacogenetics, deep-brain stimulation (DBS) or by performing lesions (see 3.4.4.2). These techniques can facilitate or disrupt the activity of a group of neurons in a local region (e.g., optogenetics), neurotransmitter systems or entire brain networks (e.g., DBS). Such interventions will allow us to establish causal relationships between neural correlates of interest, which is one of the key aims of this proposal. For these experiments, we will measure the difference in neuronal responses between a baseline time when the manipulation had not been performed and following this intervention. Measurements will be collected using neurobiological activity using calcium imaging, electrophysiology, electrochemistry, microdialysis, and fMRI (see 3.4.4.3).

“Neuro-measurement” techniques to measure brain activity in anesthetized rodents (techniques previously described in **3.4.4.2**) are:

Measure-1) electrophysiology to assess neuronal firing and brain network activity

Measure-2) electrochemistry to assess fast neurotransmitter release (e.g., fast-scan cyclic voltammetry)

Measure-3) microdialysis to assess slow neurotransmitter release

Measure-4) calcium imaging to assess neuronal ensemble activity

Both neuronal activity and neurotransmitter release are studied and measurements focus on both local and global processes. We need such an array of measurement techniques to increase the chance that we can identify the neurobiological correlates of the behavior studied and thus find targets for subsequent intervention experiments (3.4.4.3), as well as targets to perform subsequent measurement experiments (3.4.4.2), or the combination of the two (3.4.4.4).

“Neuro-intervention” techniques to measure brain activity in anesthetized rodents (techniques previously described in **3.4.4.3**) are:

Intervent-1) Deep-brain stimulation (DBS)

Intervent-2) pharmacogenetics

Intervent-3) optogenetics

Intervent-4) lesions

Intervent-5) pharmacological treatments

One “neuro-measurement” technique will be combined with one “neuro-intervention” technique.

**Neuro-intervention and neuro-measurement in brain slices:** After sacrificing the animal and collecting the brain, neuronal activity will be manipulated in brain slices using pharmacology, optogenetics, pharmacogenetics, or by DBS (see 3.4.4.2). Such interventions will allow us to establish causal relationships between neural correlates of interest. Measurements will be collected using neurobiological activity using calcium imaging, electrophysiology, and electrochemistry (see 3.4.4.3).

In a subset of animals, we will perform this procedure (3.4.4.5) at the end of a pilot study/experiment carried out under a different procedure (up to 25% of the animals from 3.4.4.1; and potentially in a small set of animals from 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4) to either reduce the number of animals needed in our project or to assess the effects of previous experience on brain function. In either scenario, no discomfort would be added.

---

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

This procedure can consist of the following steps:

1. Animals are housed together until they become at least young adults (8 weeks of age). Then they are handled and weighed frequently.
  2. (optional) In case of calcium imaging (Measure-4), a virus (e.g., AAV) that will express proteins that make calcium fluorescent and thus optically detectable, is infused into the brain via stereotactic microinfusion (under proper anesthesia (e.g., isoflurane) and perioperative analgesia; at least 3-4 weeks recovery from this surgery to allow the virus to express). Similarly, in case of
-

pharmacogenetics (Intervent-2) and optogenetics (Intervent-3), a virus that will express proteins that will make infected neurons sensitive to pharmacological (e.g., clozapine-N-oxide) or optical (e.g., light-sensitive so-called opsins) treatment, is infused.

3. For the anesthetized experiments: Measurement devices are acutely lowered into the animals' brains through holes that are drilled into the skull (under proper anesthesia (e.g., urethane) and perioperative analgesia). Some the equipment will be anchored onto the animals' skull with screws and dental cement. Depending on the technique, the devices consist of electrodes (Measure-1 and Measure-2), a guide cannula to enable lowering of electrodes (Measure-2) or a semipermeable membrane (Measure-3), fiber optics (Measure-4), or a post for head fixation (Measure-4). During the same surgery, intervention devices are lowered into the animals' brains. Some of the devices will be anchored onto the animals' skull with screws and dental cement. Depending on the technique, the devices consists of electrodes (Intervent-1), a guide cannula to enable the infusion of pharmacological agents (Intervent-2, Intervent-4, and Intervent-5), or fiber optics (Intervent-3). For the brain slice experiments: Animals will be sacrificed and the above mentioned measurement and intervention techniques will be applied in brain slices.

Testing of females. When we use female animals, estrous cycle may be checked frequently to control for potential sex hormonal effects on the brain and to determine when to conduct crucial parts of the experiments (e.g., experiments on females should all take place in the same period of the estrous cycle to prevent divergent effects of sex hormones on the brain). A small subset of female animals (under proper anesthesia and perioperative analgesia) is ovariectomized to control for variability due to estrous cycle. Surgery and recovery: 1 week.

After completion of the collection of data, the animals will be sacrificed (overdose of Nembutal and perfused for brain fixation) and their brains will be collected for histology and immunohistochemistry (e.g., stains to confirm the localization of the electrodes/other devices, stains to assess viral expression, and/or stains to assess the effects of "neuro-intervention" (e.g., electrode stimulation)). In the case of electrophysiology and voltammetry a small electrolytic lesion under continued anesthesia will precede the Nembutal treatment and perfusion (animal is still under proper anesthesia; no additional discomfort for the animal). Thus, animals will not recover from surgery/anesthesia.

---

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

---

Pilot experiments: Establishing new or adapted procedures requires step-by-step introduction and adaptation on the basis of obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Qualitative analysis: when experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on the pilots and on literature data.

Quantitative analysis: when experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

---

## **B. The animals**

---

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

Species used:

*Mice (mus musculus): genetically modified and wild type; mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats (rattus norvegicus): genetically modified and wild type; rats are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.*

*Rats and mice are the best investigated mammal species used for fundamental research with significant knowledge about the anatomy and physiology of the rodent brain. The latest, most sophisticated technologies for investigating brain mechanisms are made for use in these species, including a variety of genetically engineered strains. It is required to use both strains because each strain offers specific advantages. Rats exhibit a greater spectrum of complex behaviors that are essential for assessing compulsive behavior and its components (and some genetic tools are available for rats). In addition,*

---

measurement techniques are more widely available and more easily applicable in rats.

*In contrast, many genetic tools are available for the manipulation of neuronal activity in mice (but mice exhibit a narrower spectrum of complex behaviors). The use of mice in addition to rats is mainly based on the availability of transgenic mice showing increased spontaneous grooming (no additional pharmacological treatment or behavioral training is required), such as the Sapap3-mutant mouse, which has been validated as an animal model for obsessive-compulsive disorder. Another factor is the possibility to study individual differences, where e.g. the fact that we breed transgenic mice (such as Sapap3-mutants) ourselves provides a natural opportunity to study individual differences.*

Sex used: *We aim for efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house. In most other cases, males are used as they present the standard sex in the literature and almost all reference protocols and publications are based on the use of male rodents. Up to now, the overwhelming majority of behavioral and physiological studies on compulsivity in animals was carried out in male rodents. However, sex differences in clinical compulsivity have been reported. We plan to evaluate the experience of studying sex differences and decide if using female rodents in other parts of this project would be of scientific value. Since we aim for an efficient use of both males and females from the animal lines that are bred in-house, in some cases both males and females are used in the same experiment. In case sex differences become focus of an experiment, it is necessary to use males and females in the same conditions and during the same time period to be able to properly compare them.*

Animal number: All animals will be young adults or adult at the start of the experiments. The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years with the introduction of new paradigms and techniques. Thus, there are some factors involved that cannot be determined precisely. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Neuro-intervention/measurement studies in anesthetized animals (3.4.4.5) contain an average of 20 animals (experimental group plus controls). Based on the present plans, we will use 1100 animals in this appendix, 400 mice and 700 rats. Approximately 75% of the animals will be exposed to moderate discomfort (recovery from stereotactic surgery for injection of virus or pharmacological agents), and the remaining 25% will experience mild discomfort. Approximately 75% of the animals will be used in the anesthetized preparation, and the remaining 25% will be used for *in vitro* slice experiments (discomfort does not differ between the two because both procedures are non-survival).

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

These types of studies are conducted in both rats and mice worldwide, making translation and extrapolation of data between research-groups feasible.

Furthermore, the procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. It is necessary to use both species because each of them offer specific advantages: Rats have a greater range of complex behaviors enabling better assessment of cognitive functions; more genetic tools and mutants are available for mice and one of our most important animal models is a mutant mouse strain.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. On basis of this previous work and

experience, statistical analysis can be performed to determine the maximum number of animals needed to obtain interpretable data.

In principle we will use both male and female rats and mice. In particular in the case of the (transgenic) animals that are bred in house, this will lead to a reduction of "breeding surplus". Some animals from 3.4.4.1 (up to 25% of 3.4.4.1 animals; but probably significantly fewer) and in small numbers from 3.4.4.2, 3.4.4.3, and 3.4.4.4 will be transferred to 3.4.4.5 for further non-behavioral experimentation to reduce the total number of animals used for our project.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anesthesia (and analgesia).

In case of stereotactic intracerebral injections of viruses or other agents (75% of the animals) prior to the experiment, close postoperative monitoring will be performed and clearly defined humane endpoints applied. Animals will be allowed to recover from surgery for one week. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

Rats and mice will be socially housed and provided with environmental enrichment.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

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

Adequate anaesthesia and analgesia is used for all procedures.

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

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

Other aspects that may compromise the welfare of the animals are:

- In case of stereotactic intracerebral injections of viruses or other agents (75% of the animals) prior to the experiment, recovery from stereotactic surgery may lead to maximally moderate discomfort.

- Unforeseen surgical complications, such as excessive bleeding, adverse reactions to the applied anesthetic, or accidental severing of nerve fibers or blood vessels.

Explain why these effects may emerge.

Surgical procedures are subject to human error. These procedures cannot be executed with 0% failure rate and seldomly increased postoperative bleeding leads to maximally moderate discomfort.

There is considerable variability within rodent populations regarding the sensitivity to anesthetics and drugs.

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

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The maximum degree of cumulative discomfort in any combination of tests/measurements/interventions will not exceed moderate discomfort. Animals will be euthanized with pentobarbital (applied by i.p. injection), if:

1. Persistent weight reduction (i.e., 20% or more compared to the weight at the experimental start in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals), or acute weight loss within 2 days (15% in animals fed ad libitum and 10% in food-restricted animals) leading to more than moderate discomfort.
2. Abnormal behavior and/or posture, immobility, dirty fur, and other signs of distress, sickness, other unexpected circumstances leading to more than moderate discomfort.
3. Open wounds in Sapap3-mutant mice leading to more than moderate discomfort (10-20 % of older (> 6 months) mice; almost none in younger Sapap3-mutants).

Indicate the likely incidence.

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

### **K. Classification of severity of procedures**

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

Level of discomfort: Most animals (~ 75%) will receive an intracranial injection during a stereotactic surgery prior to the above described non-survival procedure. The recovery of this surgery is deemed moderate discomfort (for one week). Thus, we estimate up to 75% of the animals to experience a period of moderate discomfort for up to one week after stereotactic surgeries; but not discomfort otherwise

because these experiments are non-survival.

In total, we estimate that of the 400 mice, 300 will experience a period of moderate discomfort for up to one week after stereotactic surgeries; the remaining 100 will experience mild discomfort.

Of the 700 rats, 525 will experience a period of moderate discomfort for up to one week after stereotactic surgeries; the remaining 175 will experience mild discomfort.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Rats and mice will be killed for histological and immunohistochemical analyses.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

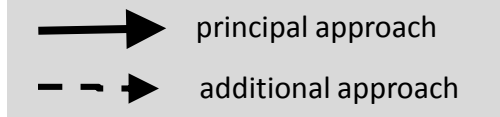


Input from clinical setting

Project [redacted] - 80101 - Nederlands Herseninstituut-KNAW  
Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements

Output to clinical setting

9



3.4.4.1 establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its components  
main read-out: **behavior**

models of compulsive behavior,  
- induced by:  
• drug self-administration  
• genetic modification  
• pharmacological treatment  
• optogenetic stimulation  
• behavioral conditions  
- characterized by:  
• escalation & persistence despite negative consequences  
are tested for components:  
• habit-formation  
• cognitive flexibility  
• fear and anxiety  
• aggravation by stress, alleviation by environmental enrichment

3.4.4.2 identification of brain correlates of compulsive behavior and its components  
main read-out: **behavior** & **neuronal activity**

**behavioral testing**  
(see box on the left)  
**plus neuro-measurement**  
1) electrophysiology  
2) electrochemistry  
3) microdialysis  
4) calcium imaging  
5) fMRI

3.4.4.3 establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation  
main read-out: **behavior**

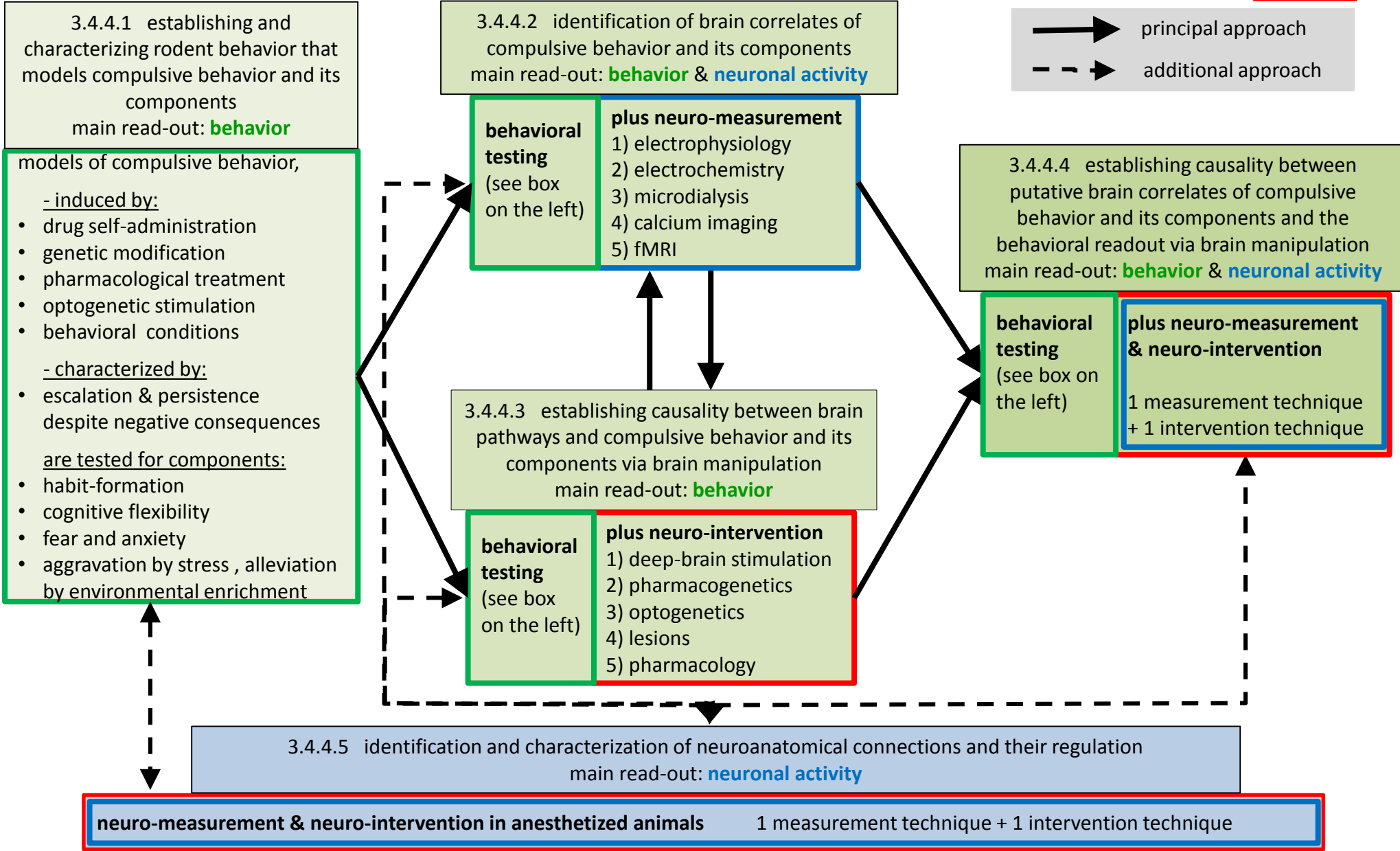
**behavioral testing**  
(see box on the left)  
**plus neuro-intervention**  
1) deep-brain stimulation  
2) pharmacogenetics  
3) optogenetics  
4) lesions  
5) pharmacology

3.4.4.4 establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation  
main read-out: **behavior** & **neuronal activity**

**behavioral testing**  
(see box on the left)  
**plus neuro-measurement & neuro-intervention**  
1 measurement technique + 1 intervention technique

3.4.4.5 identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation  
main read-out: **neuronal activity**

**neuro-measurement & neuro-intervention in anesthetized animals** 1 measurement technique + 1 intervention technique



	Procedure			mild	moderate
3.4.4.1	<b>Behavioral testing only</b>	Group 1a	rats	300	
		Group 1b	rats		700
		Group 1c	mice	150	
		Group 1d	mice		350
3.4.4.2	<b>Behavioral testing plus neuro-measurement</b>	Group 2a	rats		700
		Group 2b	mice		350
3.4.4.3	<b>Behavioral testing plus neuro-intervention</b>	Group 3a	rats		700
		Group 3b	mice		350
3.4.4.4	<b>Behavioral testing plus neuro-measurement and neuro-intervention</b>	Group 4a	rats		150
		Group 4b	mice		150
3.4.4.5	<b>Neuro-measurement and neuro-intervention in anesthetized animals</b>	Group 5a	rats	175	
		Group 5b	rats		525
		Group 5c	mice	100	
		Group 5d	mice		300
Total rat		<b>3250</b>		475 14.6%	2775 85.4%
Total mice		<b>1750</b>		250 14.3%	1500 85.7%

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD/801002015126
2. Titel van het project: Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements.
3. Titel van de NTS: Compulsief gedrag en zijn componenten: neurobiologische metingen en hersenstimulatie
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: KNAW
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 19-06-2015
  - aanvraag compleet (herziening) ontvangen: 13-07-2015
  - in vergadering besproken: 29-06-2015
  - anderszins behandeld: n.v.t.
  - termijnonderbreking(en): n.v.t.
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen:
  - aanpassing aanvraag:
  - advies aan CCD: 15-07-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum: n.v.t.
  - Plaats: n.v.t.
  - Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
  - Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager:
  - Datum 30-06-2015
  - Strekking: suggesties voor completering van de aanvraag
  - Datum antwoord (gecompleteerde versie): 13-07-2015
  - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompleteerd
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

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

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. Er is enige overlap met een aantal al van een positief advies voorziene DEC-protocollen.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningsaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

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

1. Het project is wetenschappelijk verantwoord.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling en de uitvoering om de doelstelling te bereiken is door de indiener duidelijk omschreven in de aanvraag: Het met behulp van dierexperimenteel werk verkrijgen van fundamenteel-wetenschappelijke neurobiologische inzichten in het ontstaan van compulsief gedrag en in de verschillende componenten die ten grondslag liggen aan compulsiviteit. Het gebruik van de bestaande proefdiermodellen voor dwangmatig gedrag en de verdere ontwikkeling van nieuwe modellen zullen een beter inzicht geven in neuronale basis van een breed scala aan neuro-psychiatrische ziektebeelden in de mens zoals obsessief-compulsieve persoonlijkheidsstoornis (OCD), verslavingsgedrag en eetstoornissen.

Het fundamenteel wetenschappelijke belang van het project acht de DEC substantieel: Compulsiviteit is betrokken bij een grote verscheidenheid aan gedragingen en afwijkingen in (componenten van) compulsiviteit en kunnen leiden tot ingrijpende gedragsstoornissen. Het verkrijgen van fundamentele wetenschappelijke kennis van de neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan compulsiviteit is van belang voor een beter inzicht in het functioneren van het gedrag van de mens. Bij het ontstaan van compulsiviteit-stoornissen zijn verschillende componenten betrokken zoals stress en angstgevoelens, de mate van gewoontevorming en het verlies van controle over doelgericht gedrag. Een betere onderbouwing van de hypothese dat de verschillende componenten en uitingen van compulsief gedrag gereguleerd worden door dezelfde of overlappende neurale circuits is van klinisch belang omdat ontregeling van deze circuits mogelijk een gemeenschappelijk oorzaak vormt voor uiteenlopende neuro-psychiatrische ziektebeelden. Inzicht in de manier waarop de verschillende hersengebieden in deze circuits bijdragen aan de regulering van (componenten van) compulsief gedrag zal niet alleen bijdragen aan een beter begrip van compulsiviteit-stoornissen in de maatschappij, het biedt ook kansen om deze stoornissen te corrigeren en bestaande therapieën (m.n. diepe hersenstimulatie) te verbeteren. Het project dient daarmee, op termijn, een belangrijk maatschappelijk belang.

4. De gekozen strategie, experimentele aanpak in combinatie met de infrastructuur op het Nederlands Herseninstituut en de expertise van de betrokken onderzoeksgroep bieden

een realistisch uitzicht op het behalen van de beoogde doelstellingen binnen gevraagde looptijd van 5 jaar van het project. De onderzoeksgroep is ingebed in een grote klinische onderzoeksgroep van de afdeling psychiatrie van ██████████, hetgeen de uitwisseling van nieuwe kennis en inzichten tussen kliniek, klinisch onderzoek en het dierexperimentele werk in grote mate bevordert. Het reeds verrichte onderzoek van de groep heeft al belangrijke resultaten en publicaties opgeleverd en vormt een goede basis voor het voorgenomen onderzoek. Het gebruik van invasieve technieken met een hoge temporele en spatiële resolutie, om zo inzicht te krijgen in de relatie tussen neuronale activiteitspatronen en compulsief gedrag, is niet mogelijk in de mens. Beide onderzoekslijnen zullen naast elkaar worden uitgevoerd met een sterke onderlinge wisselwerking. Het dierexperimenteel onderzoek richt zich primair op een drietal verschillende diermodellen die reeds in het lab aanwezig zijn maar in het kader van het project zal ook worden onderzocht of andere modellen kunnen toegevoegd om zo de verschillende componenten van compulsief gedrag in optimale modellen te kunnen onderzoeken.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Zowel de mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt. Het is een noodzakelijk onderdeel van de proeven dat een deel van de dieren gedurende een korte of langere tijd solitair wordt gehuisvest. In die periode kunnen de dieren elkaar wel zien, horen en ruiken. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het cumulatieve ongerief gepaard gaand met de dierproeven, zoals beschreven in de vier verschillende type dierproeven, is naar inschatting van de DEC, voor het merendeel van de dieren matig (85% van de 1750 muizen en de 3250 ratten) en voor de overige dieren licht. Deze inschatting van de DEC is volledig in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief zoals dat is geclassificeerd door de onderzoekers. Hun classificatie is gebaseerd op hun ervaring met de gebruikte modellen in vergelijkbare, al uitgevoerde, dierproeven.  
Er moet worden opgemerkt dat in sommige modellen het noodzakelijk is om aversieve stimulaties (bijvoorbeeld pijnlijke korte elektrische schokken) te gebruiken als onderdeel van de gedragstesten en dat pijnbestrijding in deze gevallen niet wordt toegepast omdat dit strijdig is met de doelstelling van het experiment. In alle andere gevallen wordt adequate pijnbestrijding gebruikt.
7. Binnen het project wordt maximaal gebruik gemaakt van methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk **vervangen**.  
Een belangrijk onderdeel van de experimentele strategie is de wisselwerking tussen gedragsstudies en klinische (interventie)studies bij de mens en het dierexperimenteel onderzoek. De klinische resultaten zullen worden gebruikt om een gerichte keuze te maken uit een groot aantal mogelijke startpunten van het dierexperimenteel werk. Voor het verkrijgen van nieuw inzicht in basis van compulsiviteit gestuurd gedrag is onderzoek op neuronaal activiteitsniveau essentieel. Met de huidige stand van de techniek kan dit type onderzoek met een sterk invasief karakter niet (of slechts bij hoge uitzondering) in proefpersonen worden uitgevoerd. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om te doelstelling van dit project te realiseren.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van **vermindering** van dierproeven. Het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit de fok draagt bij aan een reductie van aantal dieren gedood in voorraad maar kan in sommige gevallen ook de variatie in de metingen verhogen waardoor er wat meer dieren ongerief zullen ondervinden. Inzicht in sekseverschillen is echter ook onderdeel van de vraagstelling.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type experimenten. Een belangrijk onderdeel van de experimentele strategie is de gefaseerde opzet zoals beschreven in onderdeel 3.4.3 en gevisualiseerd in de bijlage "flow chart". Eerst wordt een nieuw model en de benodigde methoden om betrouwbare uitleesparameters met een zo laag mogelijke variabiliteit te behalen volledig geoptimaliseerd. Daarna wordt overgegaan tot vervolgexperimenten om (i) de neuronale activiteit gekoppeld aan het gedrag te bestuderen of (ii) een interventie strategie te bestuderen. Pas daarna zullen de neuronale activiteitsbepalingen en de interventies in een enkel dier worden bestudeerd. Op die manier wordt een empirische cyclus doorlopen, waarbij kennis uit voorgaande proeven leidt tot een optimaal design van de vervolgexperimenten, waardoor per experiment telkens niet meer dan het minimum aantal benodigde dieren wordt ingezet. Technieken en procedures worden zorgvuldig toegepast. Het totaal aantal te gebruiken dieren in het project is een realistische schatting, mede gebaseerd op de aantallen dieren gebruikt in het verleden in vergelijkbare experimenten.

9. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van **verfijning** van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.

Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn en wel op de volgende manieren: 1) het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig/mogelijk, 2) toepassing van stress-verminderende procedures, 3) een intensieve monitoring van de proefdieren gecombineerd met duidelijk gedefinieerde humane eindpunten.

Er moet worden opgemerkt dat in sommige van de modellen het noodzakelijk is om aversieve stimulaties (bijvoorbeeld het toedienen van korte elektrische schokken met een pijnlijk effect) te gebruiken als onderdeel van de gedragstesten en dat pijnbestrijding in deze gevallen niet wordt toegepast. De DEC acht dit onvermijdbaar voor het bereiken van het doel van het onderzoek (in alle andere gevallen wordt een adequate pijnbestrijding gebruikt).

Daarnaast wordt in sommige proeven een deel van de dieren gedurende een korte of langere tijd solitair gehuisvest. In die periode kunnen de dieren elkaar wel zien, horen en ruiken. De DEC acht dit onvermijdbaar voor het bereiken van het doel van het onderzoek.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is geformuleerd in begrijpelijke taal. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

De centrale vraag voor de ethische afweging is of het belang van het doel van dit project opweegt tegen het ongerief dat de dieren ondergaan (geclassificeerd voor het merendeel van

de dieren als matig). Het doel van het project is het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in het ontstaan van compulsief gedrag en de verschillende componenten die ten grondslag liggen aan compulsiviteit. Het onderzoek is primair fundamenteel wetenschappelijk van karakter maar door een inbedding in een klinische onderzoeksgroep zijn bevindingen uit het dierexperimenteel werk ook direct toegankelijk voor een eventuele klinische toepassing. De verwachting is dat de resultaten van het onderzoek, op termijn, kunnen bijdragen aan een beter inzicht in de oorzaken van verschillende ziektebeelden waarbij een stoornis in compulsiviteit betrokken is. Het project dient daarmee, op termijn, *een belangrijk maatschappelijk belang*.

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van hoge kwaliteit en het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. De onderzoeksgroep beschikt over ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde typen dierproeven. De DEC is van mening dat de resultaten van de dierproeven zullen bijdragen aan het behalen van de geformuleerde doelstellingen en schat de kans op het realiseren van deze doelstellingen in als hoog. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is onmisbaar om te komen tot een beter begrip van de neurobiologische mechanismen die een rol spelen in compulsiviteit en het project dient daarmee een *substantieel wetenschappelijk belang*.

Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald.

De DEC merkt op dat het een aanvraag betreft met de inzet van een groot aantal verschillende modellen voor compulsiviteit en componenten van compulsiviteit gekoppeld aan verschillende meetmethoden van neuronale activiteit en methoden voor interventie. Dit schept een situatie waarbij een groot aantal verschillende combinaties mogelijk zijn. De DEC onderkent dat het voorgestelde onderzoek een sterk exploratief karakter heeft waarbij het moeilijk in te schatten is welke van de combinaties de grootste wetenschappelijke opbrengst zullen hebben. De randvoorwaarden zijn naar de mening van de DEC voldoende duidelijk vastgelegd zodat een ethische afweging mogelijk is. De IvD zal scherp moeten toezien dat de ingediende studieprotocollen binnen de afbakening van het projectvoorstel blijven.

De DEC komt tot de conclusie dat de doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van de proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief van de proefdieren rechtvaardigen.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD
  - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's gesignaleerd tijdens het beoordelen van de aanvraag of het formuleren van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

Datum 15-07-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
2

Geachte heer [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juli 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven is AVD801002015126.  
Gebruik dit nummer als u contact met ons 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 ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie 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 betalen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD801002015126

Factuurdatum 15 juli 2015  
Vervaldatum 15 augustus 2015  
Factuurnummer 201570126  
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

# Factuur

**Omschrijving**

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD801002015126

**Bedrag**

€ 741,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** secretariaat DEC [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 15 juli 2015 11:15  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: indienen nieuwe PVA en CCD vergaderdatum en AVD-801002015126

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Nogmaals dank voor het doorgeven van deze nuttige informatie.  
Ik heb zojuist alle documenten voor AVD-801002015126- [REDACTED] naar de CCD gestuurd via webftp. Het getekende aanvraagformulier wordt vandaag per post gestuurd.

Groet [REDACTED]  
DEC-KNAW

---

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Sent:** Monday, July 06, 2015 3:08 PM  
**To:** secretariaat DEC  
**Subject:** RE: indienen nieuwe PVA en CCD vergaderdatum

Beste meneer [REDACTED]

De optimale indiendata voor de verschillende CCD vergaderingen moeten nog door de CCD worden vastgesteld. Ik kan daarop vooruitlopend wel aangeven dat de optimale indiendatum voor de volgende CCD vergadering 15 juli is.  
Ik hoop u hiermee voorlopig voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

---

**Van:** secretariaat DEC [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 14:54  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** indienen nieuwe PVA en CCD vergaderdatum

Geachte CCD-medewerker,

Ik zou van u graag de uiterste PVA- inleverdatum ontvangen voor de volgende CCD bijeenkomst. Het verstrekken van deze informatie is op de laatste bijeenkomst toegezegd door de CCD. Op dit moment hebben we een aantal PVA in behandeling en willen graag iets meer zicht op een optimale indiendatum.  
Ik hoor graag van u.

Groet [REDACTED]  
DEC-KNAW

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.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 20 juli 2015 13:46  
**Aan:** ZBO-CCD  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Re: Aanvraag AVD801002015126

**Categorieën:** [REDACTED]

To whom it may concern at the Centrale Commissie Dierproeven,

I would like to make sure that you are aware that the payment for our application AVD801002015126 is being submitted as soon as possible. Our finance department ensures us that it will be made by Friday, July 24.

Thank you.

Best,  
[REDACTED]

-----  
[REDACTED]  
Group Leader & Principal Investigator  
Team [REDACTED] Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW) &  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED] Amsterdam  
The Netherlands

[REDACTED]

---

From: ZBO-CCD <[ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)>  
Sent: Wednesday, July 15, 2015 1:43 PM  
To: [REDACTED]  
Cc: [REDACTED]  
Subject: Aanvraag AVD801002015126

Geachte heer [REDACTED]

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) Nationaal Comité advies dierproevenbeleid  
[www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl) .....

Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

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.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 31 juli 2015 13:35  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD801002015126  
**Bijlagen:** AVD801002015126\_Vervolgbrief.pdf

Geachte heer [REDACTED]  
Bijgevoegde brief is u vandaag ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

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

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
-

Datum 31-07-2015  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 15 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" met aanvraagnummer AVD801002015126. Wij gaan uw aanvraag beoordelen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 08 september 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen.

Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Andere regelgeving**

Hierbij wijzen wij u erop dat naast de regels die op de uitvoering van dierproeven van toepassing zijn op grond van de Wet op de dierproeven, er mogelijk ook verplichtingen kunnen voortvloeien uit andere wet- en regelgeving. In dit verband kan bijvoorbeeld worden gewezen op de Flora- en faunawet ten aanzien van in het wild levende dieren en de CITES-regelgeving ten aanzien van beschermde diersoorten.

Het besluit op uw aanvraag heeft alleen betrekking op de Wet op de Dierproeven en niet op andere wet- en regelgeving.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
-

Datum 31-07-2015  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 15 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" met aanvraagnummer AVD801002015126. Wij gaan uw aanvraag beoordelen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 08 september 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen.

Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Andere regelgeving**

Hierbij wijzen wij u erop dat naast de regels die op de uitvoering van dierproeven van toepassing zijn op grond van de Wet op de dierproeven, er mogelijk ook verplichtingen kunnen voortvloeien uit andere wet- en regelgeving. In dit verband kan bijvoorbeeld worden gewezen op de Flora- en faunawet ten aanzien van in het wild levende dieren en de CITES-regelgeving ten aanzien van beschermde diersoorten.

Het besluit op uw aanvraag heeft alleen betrekking op de Wet op de Dierproeven en niet op andere wet- en regelgeving.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 10 augustus 2015 15:35  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD801002015126  
**Bijlagen:** 2. AVD-801002015126 NTS revised.docx

Beste [REDACTED]

Dank voor je verzoek voor aanvullende informatie m.b.t. de NTS. Een punt van aandacht voor toekomstige PVA stukken.

Namens de onderzoeker stuur ik als bijlage bij deze mail een herziene versie van de NTS.

Graag een bevestiging van ontvangst.

Groet [REDACTED]

[REDACTED] DEC-KNAW

---

**From:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Sent:** Monday, August 10, 2015 1:23 PM  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** Info-zbo  
**Subject:** Aanvullende informatie aanvraag AVD801002015126

Beste Heer [REDACTED]

Zie bijgevoegde brief betreffende uw aanvraag AVD801002015126.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

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

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 10 augustus 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" met aanvraagnummer AVD801002015126. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Niet technische samenvatting**

De niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat een verwijzing naar appendix 1 (bij vraag 3.6). De NTS moet zelfstandig leesbaar zijn, daarom aan u het verzoek om deze verwijzing te verwijderen.

Graag ontvangen wij een nieuwe versie van de Niet technische samenvatting.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**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.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

**Datum**

10 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD801002015126



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121  
1000 GC Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

**Uw referentie**  
-

**Bijlagen**  
1

Datum 12 augustus 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 15 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" met aanvraagnummer AVD801002015126. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 11 augustus 2015 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Op ons verzoek heeft u een kleine wijziging aangebracht in de Niet technische samenvatting, zodat deze op zichzelf leesbaar is.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Gelet op het gegeven dat de aanvraag dierproeven bevat die op grond van de oude regelgeving nog uitgevoerd mocht worden en deze proeven (opnieuw) ter beoordeling zijn voorgelegd, mogen deze proeven alleen nog worden uitgevoerd onder deze door de CCD afgegeven vergunning.

U kunt met uw project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 augustus 2015 tot en met 01 augustus 2020. De looptijd van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum op uw aanvraag in het verleden ligt.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC KNAW gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 juli 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
 Naam: KNAW  
 Adres: Postbus 19121  
 Postcode en woonplaats: 1000 GC Amsterdam  
 Deelnemersnummer: 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 augustus 2015 tot en met 01 augustus 2020, voor het project "Neurobiology of compulsive behavior and its components: Brain stimulation and measurements" met aanvraagnummer AVD801002015126, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC KNAW. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Group Leader.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 juli 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15 juli 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 11 augustus 2015 (herziene versie);
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 15 juli 2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Establishing and characterizing rodent behavior that models compulsive behavior and its component	Muis (Mus musculus) Rat (Rattus norvegicus)	500 muizen 1000 ratten	30% licht, 70% matig	Zie onder.
Identification of brain correlates of compulsive behavior and its components	Muis (Mus musculus) Rat (Rattus norvegicus)	350 muizen 700 ratten	matig	Zie onder
Establishing causality between brain pathways and compulsive behavior and its components via brain manipulation	Muis (Mus musculus) Rat (Rattus norvegicus)	350 muizen 700 ratten	matig	Zie onder
Establishing causality between putative brain correlates of compulsive behavior and its components and the behavioral readout via brain manipulation	Muis (Mus musculus) Rat (Rattus norvegicus)	150 muizen 150 ratten	matig	Zie onder
Identification and characterization of neuroanatomical connections and their regulation	Muis (Mus musculus) Rat (Rattus norvegicus)	400 muizen 700 ratten	300 muizen matig, 100 muizen licht. 525 ratten matig, 175 ratten licht	



**Datum**  
12 augustus 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD801002015126

### **Voorwaarden**

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen  
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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

Er is enige overlap met een aantal al van een positief advies voorziene DEC protocollen.  
Bij ingang van deze vergunning mogen de proeven die zijn beschreven in eerder van positief advies voorziene DEC protocollen alleen nog worden uitgevoerd onder deze door de CCD afgegeven vergunning.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 13 augustus 2015 8:40  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Beschikking AVD801002015126  
**Bijlagen:** AVD801002015126\_Beschikking.pdf

Beste heer [REDACTED]  
Bij deze alvast per e-mail de beschikking betreffende uw aanvraag AVD801002015126.  
Het origineel wordt u per post toegezonden.

M.vr.gr.

[REDACTED]

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

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS 2015134</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x	x	x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x	x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x	x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x	x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x	x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x	x	x	x	
9	Ontvangstbevestiging I				x		x	x	
10	Acceptatiebrief				x		x	x	
11	Verzoek DEC-advies				x		x	x	
12	Mail DEC-advies 4-6-2015				x		x	x	
13	DEC-advies				x		x	x	
14	Mail aanvullende informatie I 24-6-2015				x		x	x	
15	Mail aanvullende informatie II 24-6-2015				x		x	x	
16	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
17	Aanvullende informatie				x		x	x	
18	Mail aanvullende informatie 7-7-2015				x		x	x	
19	Ontvangstbevestiging II				x		x	x	
20	Verzoek aanvulling 5-8-2015				x		x	x	
21	Beschikking en vergunning				x		x	x	
22	Advies CCD		x						x



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> KvK-nummer <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span>
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Postbus <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Postcode en plaats <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> IBAN <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Tenaamstelling van het rekeningnummer <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span>
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie Principle Investigator Afdeling <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Telefoonnummer <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> E-mailadres <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span>
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie PhD-student Afdeling <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> Telefoonnummer <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> E-mailadres <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span>

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 \_ 0 5 \_ 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 \_ 0 5 \_ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC [REDACTED]
- Postadres [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]

## 4 Betaalgegevens

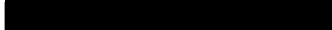
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- bijlagen beschrijving dierproeven, totaal aantal:5

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats 

Datum 08 - 06 - 2015

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

#### Aanleiding:

Rechter ventrikel (RV) falen is de belangrijkste complicatie bij patiënten met congenitale hartafwijkingen (CHA). Voor RV falen bestaan nog geen specifieke therapieën, deels om dat de origine nog onbekend is.

CHA zijn de meest voorkomende geboortefwijkingen: 0,8% van alle pasgeboren baby's heeft een hartafwijking. Ondanks de sterke verbetering in overleving van CHA in de kinderjaren, is de overleving na 45 jaar slechts 89 procent voor alle CHA. Voor complexe CHA is deze overleving lager. Bovendien ontstaat er op volwassen leeftijd in toenemende mate RV falen, pulmonale hypertensie en ritmestoornissen(1). Deze problemen bedreigen zowel de overleving als de kwaliteit van leven. Hartfalen neemt hierbij de belangrijkste rol in: 24 tot 40 % van alle doodsoorzaken gerelateerd aan CHA zijn het gevolg van progressief hartfalen(2). Dit hartfalen komt met name voor bij de aandoeningen waarbij de RV is aangedaan. Zo heeft 40% van de patiënten met een gecorrigeerde Tetralogie van Fallot (een belasting van de rechter ventrikel) hartfalen op de leeftijd van 25 jaar. De oorzaken van dit RV falen zijn nog goeddeels onbekend. Ook bij pulmonale hypertensie is RV falen de belangrijkste doodsoorzaak (3). Pulmonale hypertensie kan voorkomen als geïsoleerde aandoening van de longvaten, dat is een zeldzame aandoening op de kinderleeftijd maar heeft een zeer slechte prognose, de 5-jaars overleving van ongeveer 50% (4).

Pulmonale hypertensie komt ook in toenemende mate voor bij overlevenden van CHA variërend van 5-25%.

Concluderend is RV falen in toenemende mate een gezondheidsprobleem bij een groeiende groep patiënten met CHA. Hun behandeling wordt belemmerd door ons gebrek aan 1) inzichten in hoe RV falen ontstaat ten gevolge van CHA (5)(6), 2) methoden om patiënten die een risico lopen vroeg op te sporen en 3) specifieke behandelingen tegen RV falen(7).

#### Achtergrond:

De mechanismen van RV falen zijn nog grotendeels onbekend. Een belangrijke trigger in het ontstaan van RV falen is chronische overbelasting. Bij nagenoeg alle patiënten met CHA zijn er restafwijkingen, ook na correctie. Die overbelasting kan bestaan uit drukbelasting, volumebelasting of een combinatie van beide(8). Let op, er dient onderscheid gemaakt te worden tussen afwijkingen die al bij de geboorte leiden tot overbelasting en afwijkingen die pas op latere leeftijd ontstaan. Dit omdat de RV na de geboorte gekoppeld is aan de longvaatcirculatie welke normaal gesproken een lage weerstand heeft, m.a.w. de afterload voor de RV wordt minder na de geboorte (in tegenstelling tot de linker ventrikel). Drukbelasting kan een onderdeel zijn van CHA (b.v. bij pulmonaalstenose, tetralogie van Fallot, systemische RV) en is dan al vanaf de geboorte aanwezig. Drukbelasting t.g.v. pulmonale hypertensie ontstaat meestal pas in de loop van het leven.

Er zijn verschillende redenen waarom het falen van de RV wezenlijk anders is dan falen van de linker ventrikel (LV)(9)(5). Ten eerst zijn de triggers anders: waar LV falen veelal ischemie/reperfusie schade t.g.v. coronairlijden als oorzaak heeft, is RV falen veelal het gevolg van aangeboren hartafwijkingen of pulmonale hypertensie. Ten tweede is de RV genetisch anders, de RV ontstaat uit het zogenaamde secondary heart field, een andere set precursor cellen die door andere signaalpaden wordt geactiveerd(10). Ten derde wordt de RV na de geboorte ontlast terwijl de belasting van de LV langzaam toeneemt. Ten vierde heeft de RV een afwijkende vorm welke de analyse van de functie bemoeilijkt(11). Tot slot vindt de perfusie van de RV via de coronairen plaats zowel

in systole als in diastole in tegenstelling tot de LV, waarbij de perfusie met name tijdens de diastole plaatsvindt. Wat deze verschillen voor gevolgen hebben voor de aanpassing aan verschillende ziektes wordt langzaam steeds duidelijker (5)(7)(8)(14)(15)(16)(18).

Er zijn nog geen effectieve behandeling voor RV falen(13). Eerdere pogingen om RV falen t.g.v. een chronische drukbelasting op volwassen leeftijd te behandelen met therapieën die gebruikt worden voor pulmonale arteriële hypertensie (phosphodiesterase 5 remmer), hebben slechts beperkte verbetering laten zien. Als preventieve strategie (behandeling starten gelijk met aanleggen drukbelasting) leidt dit tot een geringe toename van de systolische functie(7), als therapeutische strategie (behandelen starten 4 weken na aanleggen drukbelasting) leidt dit tot een verbetering van de diastolische functie (14). De verschillen leidden echter niet tot een klinisch relevante toename in het inspanningsvermogen. (7)(8,15,16). Remmen van het ACE-systeem, een zeer belangrijk onderdeel van de behandeling van linker ventrikel falen, heeft geen effect op RV falen (15). Beta blokkers lijken vooral effect te hebben op de longvaatweerstand in dieren met PAH, de effecten op de RV zijn nog onbekend(17).

Het gebrek aan effectieve behandelingen is veroorzaakt door een gebrekkig inzicht in de mechanismen van RV falen. Recent onderzoek heeft aangetoond dat in volwassen dieren RV falen na drukbelasting gepaard gaat met een toegenomen knijpkracht (systolische functie) en progressieve afname van de relaxatie (diastolische dysfunctie)(14).

Van RV falen t.g.v langdurige volumebelasting weten we nog heel weinig (18)(16). Een langdurige volumebelasting, b.v. ten gevolge van een lekkende pulmonaalklep na correctie van de Tetralogie van Fallot is een veel voorkomend probleem bij overlevenden van CHA.

Aangezien ook hier diastolische dysfunctie een rol lijkt te spelen zouden mogelijk dezelfde processen als bij RV falen t.g.v. drukbelasting betrokken kunnen zijn (12). Ook voor RV falen t.g.v. volume belasting is tot nu toe geen effectieve behandelstrategie. Om nieuwe therapieën voor RV Falen te kunnen ontwikkelen is meer kennis nodig over de mechanismen van RV falen.

Er zijn nieuwe inzichten in groei en proliferatie van het hart die van belang kunnen zijn voor de adaptatie en regeneratie van de RV bij CHA en het ontstaan van RV falen (20). Het kinderhart groeit snel en heeft het vermogen cellen te vernieuwen nadat schade is ontstaan. Voorheen werd gedacht dat de hartspeer weinig/geen vermogen had tot regeneratie. Recent is echter bekend geworden dat hartspeercellen ook na de geboorte nog kunnen delen (21) en kunnen regenereren (20). We nemen aan dat deze eigenschappen een belangrijke rol spelen bij het behoud van de structuur en functie van het hart, ondanks de chronische overbelasting tijdens de jeugd. Uitputting van deze bronnen zou een voorbode voor het ontstaan van RV falen kunnen zijn.

Exploratie van de normale groei en proliferatie en de bijdrage daarvan aan de aanpassing aan aangeboren hartafwijkingen kan leiden tot nieuwe therapeutische opties.

Context:

Centraal bij dit onderzoek staat het doel om de prognose en kwaliteit van leven van patiënten met CHA te verbeteren.

heeft als doel inzicht te krijgen in hoe hartafwijkingen invloed hebben op groei en functie van het hart op kinderleeftijd, 2) manieren om patiënten die een risico lopen vroeg op te sporen en 3) specifieke behandelingen tegen hartfalen als gevolg van aangeboren hartafwijkingen te ontwikkelen. Een van de problemen bij het ontwikkelen van behandelingen voor patiënten met CHA is dat er nog geen/weinig patiënten materiaal beschikbaar is om te

bestuderen. [REDACTED]

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van dit project is om RV falen vroegtijdig te herkennen en te behandelen.

Om deze hoofddoelen te bereiken zullen we:

A) De rol van groei en proliferatie in de adaptatie aan CHA exploreren.

B) De rol van [REDACTED] en metabole veranderingen in het ontstaan van RV falen t.g.v. [REDACTED] druk- of volumebelasting toetsen.

A) De rol van groei en proliferatie in de adaptatie aan CHA exploreren:

De hypothesen die we toetsen in dit onderzoek zijn :

1) Het groei en herstelvermogen van het kindhart beschermt tegen overbelasting zoals bij CHA.

2) [REDACTED]

3) Uit deze beschermende processen zijn meetbare factoren af te leiden die voorspellen wanneer behoud van structuur en functie overgaan in dreigend hartfalen.

Om deze hypothesen te toetsen richten onze studies zich op het in kaart brengen van de bijdrage van groei en proliferatie aan de ontwikkeling van het normale hart en aan het hart met een chronisch abnormale belasting zoals voorkomt bij CHA.

(B) De rol van inflammatie en metabole veranderingen in het ontstaan van RV falen t.g.v. [REDACTED] druk- of volumebelasting toetsen.

De hypothesen die we toetsen zijn :

4) RV falen bij drukbelasting ontstaan na de jeugd (met name diastolisch falen) wordt gekenmerkt door [REDACTED] activatie die kan leiden tot ongunstige metabole veranderingen en [REDACTED].

5) RV ventrikel falen in respons op langdurige volume belasting wordt veroorzaakt door dezelfde intracellulaire processen.

6) [REDACTED]

Om deze hypothesen te toetsen is het eerste doel het maken van een temporele-spatiale analyse van de mate van [REDACTED] veranderingen in RV weefsel in relatie tot de RV functie in het ontstaan van RV falen na een [REDACTED] drukbelasting (opgelopen na de jeugd). Ten tweede zullen we dit profiel vergelijken met de temporele-spatiale analyse van RV falen ten gevolge van [REDACTED] volume belasting

[REDACTED]  
Haalbaarheid:

Voor de doelen van dit project zijn de volgende elementen nodig:

- 1) [REDACTED]
- 2) Functionele analyse van RV adaptatie en RV falen.
- 3) Bio-moleculaire analyse van de signalen betrokken bij RV falen.
- 4) [REDACTED]

[REDACTED] uitgebreide  
ervaring met het klinisch evalueren van RV adaptatie. [REDACTED], is echocardiografische expertise aanwezig en beschikken we  
over de techniek om met behulp van de gouden standaard RV functie te kunnen bepalen [REDACTED]). [REDACTED]

Ad 3) Zoals in eerder onderzoek aangetoond, zijn wij in staat de meeste biomoleculaire onderzoeken te verrichten. We werken nauw samen met de afdeling  
[REDACTED] Voor de metingen  
van de metabolieten werken we samen met [REDACTED].

### 3.3 Belang

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

Het belang van dit project is een verbeterde levensverwachting van patiënten met CHA en Pulmonale Hypertensie, door rechtsfalen te behandelen en eerder te onderkennen.

Ondanks de sterke verbetering in overleving van congenitale hartafwijkingen, is de 45-jaaroverleving ongeveer 89 procent. Deze overleving is nog lager als je alleen naar de ernstige CHA kijkt. Belangrijke problemen die leiden tot vroege dood en/of vermindering van kwaliteit van leven zijn: hartfalen,

ritmestoornissen en pulmonale hypertensie. Progressief hartfalen neemt hierbij de belangrijkste rol in; 24 tot 40 procent van alle doodsoorzaken gerelateerd aan congenitale hartafwijkingen zijn het gevolg van progressief hartfalen. RV dysfunctie is een belangrijke voorspeller van progressief hartfalen. Pulmonale hypertensie is een ziekte die zeldzaam is (2,3 per 1.000.000), maar een 5-jaarsoverleving heeft van < 50%. Rechter hartfalen is de belangrijkste gerelateerde doodsoorzaak bij pulmonale hypertensie.

De resultaten die voortkomen uit dit project zullen bijdragen aan:

- 1) Kennis van het mechanisme van hartfalen bij CHA, mogelijk nieuwe strategie-en om regeneratie potentieel te verhogen en daarmee falen uit te stellen/voorkomen
- 2) Betere identificatie van de patiënten die een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van hartfalen en mogelijke biomarkers die de uitkomst voorspellen.
- 3) Behandel strategieën om rechtsfalen bij CAH te voorkomen
- 4) De uitkomstparameters van deze resultaten zijn klinisch relevante en meetbare parameters als [REDACTED]

[REDACTED] Daarom zullen de resultaten van deze studies snel toepasbaar zijn voor de patiënten.

Rechtsfalen ten gevolge van ziekten van de linker ventrikel komt ook in toenemende mate voor. De resultaten van dit onderzoek zijn wellicht ook toepasbaar op de groeiende groep patiënten met rechtsfalen secundair aan linksfalen.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De te volgens strategie voor:

(A) Exploreren van de rol van groei en proliferatie in de adaptatie aan CHA.

Voor dit doel zullen we een [REDACTED]

Om meetbare factoren te vinden die voorspellen wanneer behoud van structuur en functie overgaan in dreigend RV falen maken we een expressie profiel in weefsel en bloed in relatie tot functionele veranderingen van de RV in aanpassing op [REDACTED] overbelasting. Deze factoren kunnen we vervolgens toetsen in de biobank die wordt opgebouwd met weefsel en bloed van patiënten met CHA die behandeld worden voor RV falen t.g.v. chronische overbelasting in het kader van het COBRA3 project.

Vervolgens zullen we, uit de verkregen atlas van groei en proliferatie in combinatie met de profielen van falen, therapeutische interventies exploreren om RV falen na behandeling van aangeboren hartafwijkingen te voorkomen.

[REDACTED] Vervolgens

zullen toetsten of dit profiel ook zo verloopt bij RV falen t.g.v. een volumebelasting.

Daarna zullen we de [REDACTED] en toetsten of dat de RV adaptatie aan drukbelasting verbeterd. Zo nodig zullen we dit ook voor RV adaptatie aan volumebelasting toetsen.

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

Op dit moment is er een gebrek aan humaan weefsel om de mechanismen van RV Falen te onderzoeken en de mogelijkheden om weefsel af te nemen zijn beperkt. [REDACTED]

diersoort hebben wij tevens de mogelijkheid het ziektebeeld te evalueren zoals wij dat in de kliniek ook doen.

De hoofdlijnen van dit project zijn:

A) De rol van groei en proliferatie in de adaptatie aan CHA exploreren.

Voor dit doel zullen wij de bijdrage van groei en proliferatie meten in met behulp van modellen die druk-, volume- of gecombineerde druk/volumebelasting nabootsen. Hierbij zullen wij een functionele analyse uitvoeren middels (inspannings)echo en PV-analyse en op zoek gaan naar signaalpaden middels bloed- en weefselanalyse.

van (rechts)falen aan de cellulaire veranderingen zal inzichten geven in de signaalpaden betrokken bij adaptatie (beschermende factoren) en falen (verslechterende factoren).

Deze factoren kunnen vervolgens getoetst worden in het verkregen materiaal van patienten dat verzameld zal worden in het kader van het project.

Na deze analyses zullen we nieuwe therapeutische interventies exploreren om RV falen na behandeling van aangeboren hartafwijkingen te voorkomen.

V: Genetisch veranderde muizen: dit onderdeel omvat experimenten met muizen waarbij middels genetische modificatie modellen worden gemaakt waarbij CHA voorkomen, dan wel targets worden benaderd die invloed uitoefenen op het ontstaan van progressief hartfalen bij CHA.

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

Ad A)  
Fase 1: Zoals hierboven beschreven is de eerste stap in dit onderzoek het in kaart brengen van de bijdrage van de verschillende signalen tijdens de gewone groei en ontwikkeling en tijdens de aanpassing aan CHA.  
Fase 2: Hieruit zullen factoren gedestilleerd worden die het ontstaan van hartfalen tegengaan of versnellen. Deze factoren zullen wij vergelijken met verworven gegevens uit een biobank

De te behalen mijlpalen zijn:

- Creëren van een kaart van groei en proliferatie van het normale hart na de geboorte.
- Creëren van een kaart van groei en proliferatie in de aanpassing op CHA.
- Verwerven van inzicht in leeftijdsafhankelijke aanpassing en herstelvermogen aan CHA.
- Lijst van potentiële biomarkers die correleren met zieke ernst of het risico op RV falen.

Ad B)  
[Redacted text block]

- Ontdekken van nieuwe therapeutische targets om RV falen te behandelen.

Bronnen:

1. Norozi K, Wessel A, Alpers V, Arnhoud JO, Geyer S, Zoega M, et al. Incidence and risk distribution of heart failure in adolescents and adults with congenital heart disease after cardiac surgery. *Am J Cardiol.* 2006;97:1238–43.
2. Zomer a. C, Vaartjes I, Uiterwaal CPM, Van Der Velde ET, Van Den Merkhof LFM, Baur LHB, et al. Circumstances of death in adult congenital heart disease. *Int J Cardiol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;154(2):168–72.* Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.09.015>



5. Friedberg MK, Redington AN. Right versus left ventricular failure: Differences, similarities, and interactions. *Circulation*. 2014;129(9):1033–44.
6. Voelkel NF, Quaife R a., Leinwand L a., Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, et al. Right ventricular function and failure: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006;114(17):1883–91.

9. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt S a. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117(13):1717–31.
10. Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell*. 2006;126(6):1037–48.
11. Ho SY, Nihoyannopoulos P. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart*. 2006;92 Suppl 1(C):i2–13.
12. Reddy S, Zhao M, Hu D-Q, Fajardo G, Katznelson E, Punn R, et al. Physiologic and molecular characterization of a murine model of right ventricular volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2013;304(10):H1314–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504182>
13. Roche SL, Redington AN. Right ventricle: Wrong targets? Another blow for pharmacotherapy in congenital heart diseases. *Circulation*. 2013;127(3):314–6.

17. De Man FS, Handoko ML, Van Ballegoij JJM, Schalij I, Bogaards SJP, Postmus PE, et al. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. *Circ Hear Fail*. 2012;5(1):97–105.

19. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: Disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115(1):176–88.
20. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;14(8):529–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3757945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park S-Y, et al. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110:1446–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3557060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302686>
22. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation

and heart size. *Science*. 2011;332(2011):458–61.

23. Tadano M, Edamatsu H, Minamisawa S, Yokoyama U, Ishikawa Y, Suzuki N, et al. Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon. *Mol Cell Biol*. 2005;25(6):2191–9.

24. Aanhaanen WTJ, Boukens BJD, Sizarov A, Wakker V, De Gier-De Vries C, Van Ginneken AC, et al. Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(2):534–44.

25. Sung MMY, Koonen DPY, Soltys CLM, Jacobs RL, Febbraio M, Dyck JRB. Increased CD36 expression in middle-aged mice contributes to obesity-related cardiac hypertrophy in the absence of cardiac dysfunction. *J Mol Med*. 2011;89(5):459–69.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Drukbelasting CHA
2	Volumebelasting CHA [REDACTED]
3	Volumebelasting CHA [REDACTED]
5	Gecombineerde druk- en volumebelasting van de rechter ventrikel bij CHA (= volgnummer 4
6	[REDACTED]
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef    |
|------------|-------------------|
| 1          | Drukbelasting CHA |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Induceren drukbelasting van de rechter ventrikel

Een toegenomen drukbelasting is een van de mechanismen die leidt tot rechter ventrikel (RV) falen. RV falen t.g.v. een drukbelasting komt frequent voor bij congenitale hart afwijkingen (CHA), v.b. pulmonaalstenose, pulmonale arteriële hypertensie en in toenemende mate patiënten waarbij de RV de functie van de linker ventrikel overneemt zoals bij het hypoplastisch linker hartsyndroom. Een toegenomen drukbelasting komt ook voor bij pulmonale hypertensie (=hoge druk in de longen), een veel voorkomend probleem bij CHA. Bij deze aandoening kan je de longziekte nabootsen. Dit heeft als nadeel dat potentiële interventies een effect kunnen hebben op de rechter kamer via de longvaat weerstand.

Echocardiografische parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn o.a. : RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie, snelheid over de PAB (Doppler), en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

3. Rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht, b) tibia lengte en/of c) lichaamsgewicht. Ook hiervoor zijn in de literatuur eerdere waarden bepaald, dit is de standaard parameter die in alle dier-studies gerapporteerd wordt.

Deze primaire uitkomstparameters zullen gekoppeld worden aan de secundaire uitkomstparameters, nl. de activatie van verschillende signaalpaden betreffende groei, proliferatie, inflammatie en metabolisme.

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.

De aard van de drukbelasting is een gefixeerde drukbelasting d.m.v. [redacted]

toegediend (zie pijnbestrijding).

[redacted] Er wordt peroperatief pijnstilling

[redacted]  
[redacted]  
[redacted] (zie pijnbestrijding).

[redacted] Er wordt postoperatief pijnbestrijding toegepast

Gedurende deze periode zullen wij meerdere malen, maar niet vaker dan een maal per week, middels niet invasieve meetmethoden de dieren vervolgen.

Dieren kunnen op elke leeftijd geofferd worden en dit is o.a. afhankelijk van het ontwikkelende fenotype. [redacted]

[redacted] Voorafgaande aan het offeren van de dieren zullen doorgaans [redacted] metingen worden uitgevoerd aan het geanestheeserde dier, die vervolgens onder anesthesie geëuthanaseerd wordt. Op deze manier kunnen we het effect van de drukbelasting op hartfunctie en welzijn van de dieren goed monitoren.

De niet invasieve meetmethodes [redacted] maken het mogelijk om vroegtijdig cardiale defecten op te sporen en de ontwikkeling hiervan te volgen. Deze monitoring en dus mogelijke vroegtijdige detectie van het fenotype kan tevens onnodig lijden van dieren voorkomen. Indien nodig kan een tredmolen voor vrijwillige beweging in de kooi worden geplaatst, omdat beweging een belangrijke parameter is voor hartfalen ontwikkeling [redacted]

[redacted] voor het [redacted]

Dit model zal ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. [redacted]

[redacted] Medicamenten kunnen toegediend worden als een preventieve strategie ([redacted])

[redacted] of als een therapeutische strategie ([redacted]).

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

Om de proeven tot een minimum te beperken zullen we de volgende maatregelen nemen:

- pilot-studies uitvoeren om ervoor te zorgen dat het microchirurgisch team de mogelijkheid krijgt om de reeds opgedane ervaring [redacted] uit te bouwen [redacted] Hiermee kan de ingreep en de daarbij horende respiratoire ondersteuning, anesthesie en analgesie worden geoptimaliseerd. Hiermee zal de uitval tot een minimum worden beperkt.
- Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses.
- De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen retrospectief ook worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.
- [redacted]
- Door niet-invasieve methoden als echografie [redacted] te gebruiken, kunnen wij de effecten van de verhoogde drukbelasting over de tijd vervolgen. [redacted]. Dit reduceert het aantal dieren.
- Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor nadere analyses (histochemie, eiwitexpressie, genexpressie, mitochondriële functie). Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

- Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De verschillen in RV functie ( [redacted] ) alsmede de verschillen in activatie van signaalpaden tussen de verschillende groepen ( [redacted] ) zullen vergeleken worden mbv ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt als alpha 0.05 aangehouden en streven we een power van >80% na.

## B. De dieren

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

Herkomst: code 2, [redacted] ). Eigen fok, [redacted] .

Geschatte aantallen: We verwachten voor de opzet van de [redacted] 60 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~85 ratten nodig. We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~400 ratten.

Diersoort: Muis

Herkomst:

- Muizen wild type: code 2, [redacted]

- Muizen genetisch gemodificeerd: code 2, eigen fok of overname ander laboratorium b.v. [redacted]

Geschatte aantallen: We verwachten voor de opzet van de functionele evaluatie in de muis (specifiek de PV loop meting) 20 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~160 muizen nodig (meer dan de ratten omdat de RV van muizen veel kleiner is, dus we kunnen niet alle bepalingen in 1 muis doen). We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~660 muizen.

Levensstadium beide diersoorten:

[redacted]

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning





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

- [Redacted]

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ongerief wordt veroorzaakt door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en de mogelijke ontwikkeling van hartfalen. In de tijd ontwikkelen deze dieren hypertrofie en hartfalen, er wordt op gelet dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreden d.m.v. adequate monitoring van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen drukbelasting.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van [REDACTED] hart falen. Bij [REDACTED] [REDACTED] ([REDACTED]) worden dieren geofferd.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Gewichtsverlies/groeivertraging >10% in 1 week of een maximaal totaal gewichtsverlies/groeivertraging van 15%.
- Zichtbare dyspnoe.
- Ernstige lethargie.
- 

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

### K. Classificatie van ongerief

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

matig

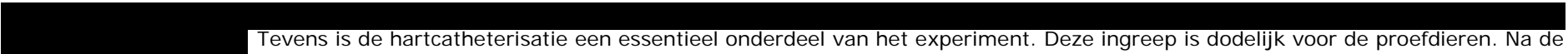
## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

 Tevens is de hartcatheterisatie een essentieel onderdeel van het experiment. Deze ingreep is dodelijk voor de proefdieren. Na de hartcatheterisatie worden het hart, de longen, de nieren uitgenomen en voor verder laboratorium onderzoek naar de signaalpaden gebruikt. Derhalve is het doden van de proefdieren essentieel.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                           |
|------------|--|
| 2          | Volumebelasting CHA <input type="text"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Induceren rechter ventrikel falen middels verhoogde volumebelasting van de rechter ventrikel.

Een toegenomen preload (=volumebelasting) is een van de mechanismen die leidt tot rechter ventrikel (RV) falen. RV falen t.g.v. een volumebelasting komt frequent voor bij congenitale hart afwijkingen (CHA), v.b. is pulmonalisklepinsufficiëntie na behandeling van tetralogie van Fallot.

Een volumebelasting van de rechter kamer kan worden gerealiseerd door het aanleggen van

. Een belangrijk voordeel van deze methode is dat de shunt relatief eenvoudig is aan te leggen.

In ons centrum is een uitgebreide ervaring aanwezig met deze chirurgische methode ( [REDACTED] ) bij muis (operatiegewicht ~22 g) en bij de rat (operatiegewicht ~180g). Deze methode zal toegepast worden bij subdoelen 5 en 6.

In de huidige aanvraag willen we ook de rol van groei en proliferatie in de aanpassing van het jonge dier (vergelijkbaar met het kind met CHA) aan toegenomen afterload bestuderen. [REDACTED]

[REDACTED]. Alvorens dit model op grotere schaal bij de jonge dieren te gebruiken, zal een pilot studie worden opgezet. De technieken die we daarvoor nodig hebben zijn allen bekend in ons lab [REDACTED]

[REDACTED]

Echocardiografische parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn o.a. : RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie, snelheid over de [REDACTED] (Doppler), en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). [REDACTED]

[REDACTED].

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

3. Rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht, b) tibia lengte en/of c) lichaamsgewicht. Ook hiervoor zijn in de literatuur eerdere waarden bepaald, dit is de standaard parameter die in alle dierstudies gerapporteerd wordt.

Deze primaire uitkomstparameters zullen gekoppeld worden aan de secundaire uitkomstparameters, nl. de activatie van verschillende signaalpaden betreffende groei, proliferatie, inflammatie en metabolisme.

[REDACTED]

---

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.

[REDACTED]

Er vindt pijnstilling rondom de ingreep plaats (zie pijnstilling).

Gedurende deze periode zullen wij meerdere malen, maar niet vaker dan een maal per week, middels niet invasieve meetmethoden de dieren vervolgen.

Dieren kunnen op elke leeftijd geofferd worden en dit is o.a. afhankelijk van het ontwikkelende fenotype. Voorafgaande aan het offeren van de dieren zullen doorgaans metingen worden uitgevoerd aan het geanestheerde dier, die vervolgens onder anesthesie geëuthaniseerd wordt. Op deze manier kunnen we het effect van de drukbelasting op hartfunctie en welzijn van de dieren goed monitoren. De niet-invasieve meetmethodes maken het mogelijk om vroegtijdig cardiale defecten op te sporen en de ontwikkeling hiervan te volgen. Deze monitoring en dus mogelijke vroegtijdige detectie van het fenotype kan tevens onnodig lijden van dieren voorkomen. Indien nodig kan een tredmolen voor vrijwillige beweging in de kooi worden geplaatst, omdat beweging een belangrijke parameter is voor hartfalen ontwikkeling

Dit model zal ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten.

of als een therapeutische strategie

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

- We zullen pilot-studies uitvoeren om ervoor te zorgdragen dat het microchirurgisch team de mogelijkheid krijgt om de reeds opgedane ervaring uit te bouwen naar . Hiermee kan de ingreep en de daarbij horende respiratoire ondersteuning, anesthesie en analgesie worden geoptimaliseerd. Hiermee zal de uitval tot een minimum worden beperkt.
- Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses.
- De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen retrospectief ook worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.
- Door niet-invasieve methoden als echografie en te gebruiken, kunnen wij de effecten van de verhoogde volumebelasting over de tijd vervolgen. Dit reduceert het aantal dieren.
- Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor nadere analyses (histochemie, eiwitexpressie, genexpressie, mitochondriële functie. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.
- Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De verschillen in RV functie alsmede de verschillen in activatie van signaalpaden tussen de verschillende groepen ) zullen vergeleken worden mbv ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt als  $\alpha$  0.05 aangehouden en streven we een power van >80% na.

## B. De dieren

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

Diersoorten: Rat

Herkomst: code 2, ). Eigen fok, .

Geschatte aantallen: We verwachten voor de opzet van de ACS in de jonge ratten 60 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze

eerdere ervaringen ~85 ratten nodig. We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~400 ratten.

Diersoort: Muis

Herkomst:

- Muizen wild type: code 2, [REDACTED]).

- Muizen genetisch gemodificeerd: code 2, eigen fok of overname ander laboratorium b.v. [REDACTED]

Geschatte aantallen: Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~160 muizen nodig (meer dan de ratten omdat de RV van muizen veel kleiner is, dus we kunnen niet alle bepalingen in 1 muis doen). We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~640 muizen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Het doel van deze studie, veranderingen in groei en aanpassingsvermogen in relatie tot functie en uitkomst vastleggen, vereist lange termijn proeven met intacte dieren. Momenteel zijn er ontwikkelingen op het gebied van 'organ on a chip', waarbij bijvoorbeeld cardiomyocyten onder gecontroleerde omstandigheden kunnen worden blootgesteld aan verschillende stressoren. Dit systeem is echter nog niet beschikbaar voor het hart. Indien er in de toekomst ontwikkelingen zijn op dit gebied, zijn wij voornemens dit te implementeren binnen het project.

Verfijning: door middel van pilot studies optimaliseren wij de chirurgische ingrepen en de daarbij behorende ondersteuning. Hierbij wordt anesthesie en analgesie toegepast om de pijn te minimaliseren. Ook zullen de dieren onder andere regelmatig worden beoordeeld op symptomen van hartfalen middels een in dit centrum ontwikkelde methode. Hiermee worden de dieren nauwlettend in de gaten gehouden en kan efficiënt worden ingegrepen wanneer de humane

eindpunten worden bereikt. De beoordeelde symptomen zijn tevens ook van toegevoegde waarde bij het interpreteren van de onderzochte effecten. Zodra zich op basis van de verzamelde gegevens markers aandienen die een voorspellende waarde hebben voor de uitkomst, kan tot vervroeging van de eindpunten besloten worden, als zich daarvoor mogelijkheden voordoen.

De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen en zijn gebaseerd op de fasering zoals beschreven in paragraaf 3.4.3 van de hoofdaanvraag. [REDACTED]

[REDACTED]

Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

[REDACTED]

Vermindering: zie paragraaf 2A.

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

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van maximaal 5 gehuisvest, in kooien met speeltjes. De dieren worden gehuisvest in een licht- en geluidsarme omgeving.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel preoperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op [REDACTED]
- [REDACTED]
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische [REDACTED] loop en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het [REDACTED].

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

- [REDACTED]



## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Ongerief wordt veroorzaakt door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en de mogelijke ontwikkeling van hartfalen. In de tijd ontwikkelen deze dieren

hypertrofie en hartfalen, er wordt op gelet dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreden d.m.v. adequate monitoring van de dieren.

2. [REDACTED]

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen volumebelasting.
2. Langetermijn gevolg van chirurgische ingreep.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van [REDACTED] hart falen. Bij [REDACTED] ([REDACTED]) worden dieren geofferd.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- • Gewichtsverlies/groeivertraging >10% in 1 week of een maximaal totaal gewichtsverlies/groeivertraging van 15%.
- • Zichtbare dyspnoe.
- • Ernstige lethargie.
- 

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

[REDACTED]

#### K. Classificatie van ongerief

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

matig

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

[REDACTED]

██████████. Tevens is de hartcatheterisatie een essentieel onderdeel van het experiment. Deze ingreep is dodelijk voor de proefdieren. Na de hartcatheterisatie worden het hart, de longen, de nieren uitgenomen en voor verder laboratorium onderzoek naar de signaalpaden gebruikt. Derhalve is het doden van de proefdieren essentieel.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



[REDACTED]).  
PI komt zeer frequent voor bij patiënten met een Tetralogie van Fallot (ToF). Zoals al genoemd is ToF de meest voorkomende cyanotische hartaandoening waarbij de behandeling in de vorige levensfase nu zeer succesvol is. Een keerzijde van het succes is een groeiende groep kinderen waarbij de opheffing van de vernauwing van arterie pulmonalis een lekkende pulmonalisklep bewerkstelligt. Dit leidt tot een geïsoleerde volumebelasting van de rechter ventrikel. In de huidige bijlage beschrijven we hoe we deze techniek ook eigen gaan maken. [REDACTED]

Echocardiografische parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn o.a. : RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie, snelheid over de PAB (Doppler), en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). [REDACTED]

[REDACTED] Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

3. Rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht, b) tibia lengte en/of c) lichaamsgewicht. Ook hiervoor zijn in de literatuur eerdere waarden bepaald, dit is de standaard parameter die in alle dier-studies gerapporteerd wordt.

Deze primaire uitkomstparameters zullen gekoppeld worden aan de secundaire uitkomstparameters. [REDACTED]

---

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.

De aarde van de ingreep is het creëren van een lekkage van de pulmonalisklep. Dit is een ingreep onder anesthesie. [REDACTED]

[REDACTED]. Hiervoor zal de onderzoeker afreizen naar centra waar deze ingreep wordt toegepast om de ingreep te leren ([REDACTED]). Bij de eerste trainingen zal er sprake zijn van een terminaal experiment, waarbij de dieren niet bijkomen uit anesthesie.

Er vindt pijnstilling rondom de ingreep plaats (zie pijnstilling).

Gedurende deze periode zullen wij meerdere malen, maar niet vaker dan een maal per week, middels niet invasieve meetmethoden de dieren vervolgen.

Dieren kunnen op elke leeftijd geofferd worden en dit is o.a. afhankelijk van het ontwikkelende fenotype. . Dit zal gebeuren via orbita of staart. Voorafgaande aan het offeren van de dieren zullen doorgaans metingen worden uitgevoerd aan het geanestheerde dier, die vervolgens onder anesthesie geëuthanaseerd wordt. Op deze manier kunnen we het effect van de belasting op hartfunctie en welzijn van de dieren goed monitoren. De niet invasieve meetmethodes maken het mogelijk om vroegtijdig cardiale defecten op te sporen en de ontwikkeling hiervan te volgen. Deze monitoring en dus mogelijke vroegtijdige detectie van het fenotype kan tevens onnodig lijden van dieren voorkomen. Indien nodig kan een tredmolen voor vrijwillige beweging in de kooi worden geplaatst, omdat beweging een belangrijke parameter is voor hartfalen ontwikkeling

Dit model zal ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten.

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

- We zullen een leertraject instellen, samen met het centrum dat hier al ervaring mee heeft.
- We zullen pilot studies uitvoeren om de ziekte ontwikkeling te kunne beschrijven.
- We zullen pilot-studies uitvoeren om ervoor te zorgdragen dat het microchirurgisch team de mogelijkheid krijgt om de reeds opgedane ervaring met uit te bouwen naar . Hiermee kan de ingreep en de daarbij horende respiratoire ondersteuning, anesthesie en analgesie worden geoptimaliseerd. Hiermee zal de uitval tot een minimum worden beperkt.
- Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses.
- De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen retrospectief ook worden gebruikt om te vergelijken met de uiteindelijke studies.
- Door niet-invasieve methoden te gebruiken, kunnen wij de effecten van de verhoogde drukbelasting over de tijd vervolgen. Derhalve hoeven deze dieren niet te worden geofferd op verschillende tijdpunten. Dit reduceert het aantal dieren.
- Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor nadere analyses . Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.
- Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De verschillen in RV functie (zoals gemeten met inspanningstest, echocardiografie en MRI ) alsmede de verschillen in activatie van signaalpaden tussen de verschillende groepen ( ) zullen vergeleken worden mbv ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt als  $\alpha$  0.05 aangehouden en streven we een power van >80% na.

## B. De dieren

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

Diersoorten: Rat

Herkomst: code 2, [REDACTED] Eigen fok, [REDACTED]

Geschatte aantallen: We verwachten voor de opzet van de [REDACTED] 60 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~85 ratten nodig. We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~400 ratten.

Diersoort: Muis

Herkomst:

- Muizen wild type: code 2, [REDACTED]

- Muizen genetisch gemodificeerd: code 2, eigen fok of overname ander laboratorium b.v. [REDACTED]

Geschatte aantallen: We verwachten voor de opzet van [REDACTED] in muizen 60 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~160 muizen nodig (meer dan de ratten omdat de RV van muizen veel kleiner is, dus we kunnen niet alle bepalingen in 1 muis doen). We verwachten 1 proef te doen. Tezamen ~220 muizen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Het doel van deze studie, veranderingen in groei en aanpassingsvermogen in relatie tot functie en uitkomst vastleggen, vereist lange termijn proeven met intacte dieren. Deze proeven moeten zo goed mogelijk de CHA nabootsen. Er is op dit moment nog geen systeem dat zoiets "in vitro" doet. Momenteel zijn er ontwikkelingen op het gebied van 'organ on a chip', waarbij bijvoorbeeld geïsoleerde cellen onder gecontroleerde omstandigheden kunnen

worden blootgesteld aan verschillende stressoren. Dit systeem is echter nog niet beschikbaar voor het hart. Indien er in de toekomst ontwikkelingen zijn op dit gebied, zijn wij voornemens dit te implementeren binnen het project.

Verfijning: door middel van pilot studies optimaliseren wij de chirurgische ingrepen en de daarbij behorende ondersteuning. Hierbij wordt anesthesie en analgesie toegepast om de pijn te minimaliseren. Ook zullen de dieren onder andere regelmatig worden beoordeeld op symptomen van hartfalen middels een in dit centrum ontwikkelde methode. Hiermee worden de dieren nauwlettend in de gaten gehouden en kan efficiënt worden ingegrepen wanneer de humane eindpunten worden bereikt. De beoordeelde symptomen zijn tevens ook van toegevoegde waarde bij het interpreteren van de onderzochte effecten. Zodra zich op basis van de verzamelde gegevens markers aandienen die een voorspellende waarde hebben voor de uitkomst, kan tot vervroeging van de eindpunten besloten worden, als zich daarvoor mogelijkheden voordoen.

De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen en zijn gebaseerd op de fasering zoals beschreven in paragraaf 3.4.3 van de hoofdaanvraag. [REDACTED]

[REDACTED]

Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

[REDACTED]

Vermindering: De resultaten van de dieren met PI zullen vergeleken worden met die van de dieren met een aorto-cavale shunt. Alleen als er belangrijke verschillen zijn zullen verdere studies met dit model noodzakelijk zijn, anders kan teruggevallen worden op de resultaten verkregen met de eerdere studies.

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

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met speeltjes. De dieren worden gehuisvest in een licht- en geluidsarme omgeving.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het [REDACTED]
- [REDACTED]
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen mbv PV loop en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het [REDACTED].

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

• • [REDACTED]





## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ongerief wordt veroorzaakt door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en de mogelijke ontwikkeling van hartfalen. In de tijd ontwikkelen deze dieren hypertrofie en hartfalen, er wordt op gelet dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreden d.m.v. adequate monitoring van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen volumebelasting.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van [REDACTED] hart falen. Bij [REDACTED] ( [REDACTED] ) worden dieren geofferd.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Gewichtsverlies/groeivertraging >10% in 1 week of een maximaal totaal gewichtsverlies/groeivertraging van 15%.
- Zichtbare dyspnoe.
- Ernstige lethargie.

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

#### K. Classificatie van ongerief

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

matig

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

[REDACTED]. Derhalve is het doden van de proefdieren essentieel.

Tevens is de hartcatheterisatie een essentieel onderdeel van het experiment. Deze ingreep is dodelijk voor de proefdieren. Tot slot worden hart, longen en

het bloed voor verder laboratoriumonderzoek gebruikt.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 4          | Gecombineerde druk- en volumebelasting van de rechter ventrikel bij CHA |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Induceren rechter ventrikel falen d.m.v. gecombineerde druk en volume belasting.

Tetralogie van Fallot is de meest voorkomende blauwe hartafwijking. Tegenwoordig is de overleving van de eerste operaties op de kinderleeftijd uitstekend, maar de lange termijn overleving wordt gekenmerkt door restafwijkingen die leiden tot progressief RV falen en ritmestoornissen. De restafwijkingen zijn het gevolg van de aanlegstoornis van de pulmonaalklep en bestaan uit toegenomen drukbelasting (reststenose), toegenomen volumebelasting (restlekkage), maar ook uit een combinatie van beide door reststenose en restlekkage. Dat is dus een zogenaamde dubbele hit voor de rechter ventrikel (Villafane 2013). Ook patiënten met een éénkamer hart waarbij de rechter kamer de systeemkamer is hebben vaak een combinatie van een druk- en volumebelasting

(Feinstein 2012). Patiënten met pulmonale hypertensie ten gevolge van een CHA hebben ook vaak een combinatie van toegenomen volumebelasting (door de CHA) en drukbelasting (door de pulmonale hypertensie).

Echocardiografische parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn o.a. : RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie, snelheid over de PAB (Doppler), en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

3. Rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht, b) tibia lengte en/of c) lichaamsgewicht. Ook hiervoor zijn in de literatuur eerdere waarden bepaald, dit is de standaard parameter die in alle dier-studies gerapporteerd wordt.

Deze primaire uitkomstparameters zullen gekoppeld worden aan de secundaire uitkomstparameters, nl. de activatie van verschillende signaalpaden betreffende groei, proliferatie, inflammatie en metabolisme.

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.

[REDACTED]

Er wordt peroperatief en postoperatief pijnstilling toegediend (zie pijnbestrijding).

[REDACTED]

Gedurende deze periode zullen wij meerdere malen, maar niet vaker dan een maal per week, middels niet invasieve meetmethoden de dieren vervolgen.

[REDACTED]

Dieren kunnen op elke leeftijd geofferd worden en dit is o.a. afhankelijk van het ontwikkelende fenotype. [REDACTED]. [REDACTED]. [REDACTED]. Voorafgaande aan het offeren van de dieren zullen doorgaans P/V loop metingen worden uitgevoerd aan het geanestheerde dier, die vervolgens onder anesthesie geëuthanaseerd wordt. Op deze manier kunnen we het effect van de drukbelasting op hartfunctie en welzijn van de dieren goed monitoren. De niet invasieve meetmethodes maken het mogelijk om vroegtijdig cardiale defecten op te sporen en de ontwikkeling hiervan te volgen. Deze monitoring en dus mogelijke vroegtijdige detectie van het fenotype kan tevens onnodig lijden van dieren voorkomen. Indien nodig kan een tredmolen voor vrijwillige beweging in de kooi worden geplaatst, omdat beweging een belangrijke parameter is voor hartfalen ontwikkeling [REDACTED]

[REDACTED]

---

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

Om de proeven tot een minimum te beperken zullen we de volgende maatregelen nemen:

- pilot-studies uitvoeren om ervoor te zorgen dat het microchirurgisch team de mogelijkheid krijgt om de reeds opgedane ervaring [REDACTED]. Hiermee kan de ingreep en de daarbij horende respiratoire ondersteuning, anesthesie en analgesie worden geoptimaliseerd. Hiermee zal de uitval tot een minimum worden beperkt.
- Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses.
- De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen retrospectief ook worden gebruikt om te vergelijken met de uiteindelijke studies.
- Door niet-invasieve methoden als [REDACTED] te gebruiken, kunnen wij de effecten van de verhoogde drukbelasting over de tijd vervolgen. [REDACTED]. Dit reduceert het aantal dieren.
- Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor nadere analyses (histochemie, eiwitexpressie, genexpressie, mitochondriële functie. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.
- Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De verschillen in RV functie ( [redacted] ) alsmede de verschillen in activatie van signaalpaden tussen de verschillende groepen ( [redacted] ) zullen vergeleken worden mbv ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt als alpha 0.05 aangehouden en streven we een power van >80% na.

## B. De dieren

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

Diersoort: Rat

Herkomst: 2, [redacted] Eigen fok, [redacted]

Geschatte aantallen:

We verwachten voor de opzet van de COMBI A en B in de jonge ratten 60 dieren nodig te hebben. Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~85 ratten nodig. We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~400 ratten.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Het doel van deze studie, veranderingen in groei en aanpassingsvermogen in relatie tot functie en uitkomst vastleggen, vereist lange termijn proeven met intacte dieren. Momenteel zijn er ontwikkelingen op het gebied van 'organ on a chip', waarbij bijvoorbeeld cardiomyocyten onder gecontroleerde omstandigheden kunnen worden blootgesteld aan verschillende stressoren. Dit systeem is echter nog niet beschikbaar voor het hart. Indien er in de toekomst ontwikkelingen zijn op dit gebied, zijn wij voornemens dit te implementeren binnen het project.

Verfijning: door middel van pilot studies optimaliseren wij de chirurgische ingrepen en de daarbij behorende ondersteuning. Hierbij wordt anesthesie en analgesie toegepast om de pijn te minimaliseren. Ook zullen de dieren onder andere regelmatig worden beoordeeld op symptomen van hartfalen middels een in dit centrum ontwikkelde methode. Hiermee worden de dieren nauwlettend in de gaten gehouden en kan efficiënt worden ingegrepen wanneer de humane

eindpunten worden bereikt. De beoordeelde symptomen zijn tevens ook van toegevoegde waarde bij het interpreteren van de onderzochte effecten. Wij achten het van belang te benoemen dat slechts een klein gedeelte van de proefdieren blootgesteld zal worden aan het eindstadium hartfalen en de hierbij horende welzijnsaantasting. Het grootste deel van de proefdieren zal in een vroegere fase worden geofferd om de gestelde onderzoeksvragen te beantwoorden.

Bij dit multiple-hit model zullen wij daarnaast geringere laesies aanbrengen met mindere ernstige belasting op het hart als gevolg. Hierdoor zal de welzijnsaantasting bij dit model niet verschillen van de andere modellen.

De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen en zijn gebaseerd op de fasering zoals beschreven in paragraaf 3.4.3 van de hoofdaanvraag. [REDACTED]

[REDACTED]

Vermindering: zie paragraaf 2A.

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

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met speeltjes. De dieren worden gehuisvest in een licht- en geluidsarme omgeving.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het [REDACTED]

- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische [REDACTED] en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het [REDACTED]

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

- [REDACTED]



## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Ongerief wordt veroorzaakt door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en de mogelijke ontwikkeling van hartfalen. In de tijd ontwikkelen deze dieren hypertrofie en hartfalen, er wordt op gelet dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreden d.m.v. adequate monitoring van de dieren.

2. Zenuwuitval achterpoten

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen volumebelasting.
2. Langetermijn gevolg van chirurgische ingreep.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Gewichtsverlies/groei vertraging >10% in 1 week of een maximaal totaal gewichtsverlies/groei vertraging van 15%.
- Zichtbare dyspnoe.
- Ernstige lethargie.
- 

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

#### K. Classificatie van ongerief

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

Matig

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

[Redacted] Derhalve is het doden van de proefdieren essentieel.

Tevens is de hartcatheterisatie een essentieel onderdeel van het experiment. Deze ingreep is dodelijk voor de proefdieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                  |
|------------|---------------------------------|
| 5          | Genetisch gemodificeerde muizen |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Genetisch gemodificeerde muizen worden gebruikt voor twee specifieke doeleinden:

SUBDOEL A (Rol van groei en proliferatie):

Het nabootsen van aangeboren hartafwijkingen en bestuderen wat de rol van groei en proliferatie is in de aanpassing aan aangeboren hartafwijkingen. Er zijn tot nu toe twee soorten genetisch gemodificeerde muizen beschreven die aangeboren hartafwijkingen hebben en overleven na de geboorte . Deze stammen zullen gebruikt worden om in samenwerking met collegae in het

SUBDOEL B

Genetisch gemodificeerde dieren zullen op verschillende leeftijden gekarakteriseerd worden.

Primaire uitkomstparameters voor deze model zijn zoals eerder beschreven:

Echocardiografische parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn o.a. :

MRI parameters waarmee we de RV functie kunnen bepalen zijn RV eind-systolische en eind-diastolische volumina, slagvolume, ejectie fractie en cardiac output.

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

3. Rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht, b) tibia lengte en/of c) lichaamsgewicht. Ook hiervoor zijn in de literatuur eerdere waarden bepaald, dit is de standaard parameter die in alle dier-studies gerapporteerd wordt.

Deze primaire uitkomstparameters zullen gekoppeld worden aan de secundaire uitkomstparameters, nl. de activatie van verschillende signaalpaden betreffende groei, proliferatie, inflammatie en metabolisme.

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.

die geboren worden met een aangeboren hartafwijking ( ) zullen vervolgd worden op klinische tekenen van aanpassing/falen

Ad b) Bij de GGM die een afwijking in een signaalpad hebben zal een druk en/of volumebelasting aangelegd worden (zoals beschreven in

[REDACTED]

Gedurende deze periode zullen wij meerdere malen, maar niet vaker dan een maal per week, middels niet invasieve meetmethoden de dieren vervolgen.

Dieren kunnen op elke leeftijd geofferd worden en dit is o.a. afhankelijk van het ontwikkelende fenotype. [REDACTED] Voorafgaande aan het offeren van de dieren zullen doorgaans [REDACTED] worden uitgevoerd aan het geanestheerde dier, die vervolgens onder anesthesie geëuthanaseerd wordt. Op deze manier kunnen we het effect van de drukbelasting op hartfunctie en welzijn van de dieren goed monitoren. De niet invasieve meetmethodes maken het mogelijk om vroegtijdig cardiale defecten op te sporen en de ontwikkeling hiervan te volgen. Deze monitoring en dus mogelijke vroegtijdige detectie van het fenotype kan tevens onnodig lijden van dieren voorkomen. Indien nodig kan een tredmolen voor vrijwillige beweging in de kooi worden geplaatst, omdat beweging is een belangrijke parameter is voor hartfalen ontwikkeling [REDACTED]

---

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

Om de proeven tot een minimum te beperken zullen we de volgende maatregelen nemen:

- we gebruiken GGM waarvan de gevolgen van de genetische modificatie op de levensontwikkeling al bekend is. We zullen pilot studies doen naar de mogelijke gunstige effecten en de experimenten.
- Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses.
- De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen in retrospect ook worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.
- [REDACTED]

[REDACTED] waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

- Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De verschillen in RV functie [REDACTED] ) alsmede de verschillen in activatie van signaalpaden tussen de verschillende groepen ( [REDACTED] ) zullen vergeleken worden mbv ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt als alpha 0.05 aangehouden en streven we een power van >80% na.

---

## B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen genetisch gemodificeerd

Herkomst: Code 2 overname van collegae ( [REDACTED] ) of ander laboratorium b.v. [REDACTED] )

Geschatte aantallen: Voor elke proef hebben we op basis van onze eerdere ervaringen ~160 muizen nodig (meer dan de ratten omdat de RV van muizen veel kleiner is, dus we kunnen niet alle bepalingen in 1 muis doen). We verwachten 4 proeven te doen. Tezamen ~640 muizen.

[REDACTED]

---

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

---

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

Nee

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

---

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging: Het doel van deze studie, veranderingen in groei en aanpassingsvermogen in relatie tot functie en uitkomst vastleggen, vereist lange termijn proeven met intacte dieren. Momenteel zijn er ontwikkelingen op het gebied van 'organ on a chip', waarbij bijvoorbeeld cardiomyocyten onder gecontroleerde omstandigheden kunnen worden blootgesteld aan verschillende stressoren. Dit systeem is echter nog niet beschikbaar voor het hart. Indien er in de toekomst ontwikkelingen zijn op dit gebied, zijn wij voornemens dit te implementeren binnen het project.

Verfijning: door middel van pilot studies optimaliseren wij de onderzoek en de daarbij behorende ondersteuning. Hierbij wordt anesthesie en analgesie toegepast om de pijn te minimaliseren. Ook zullen de dieren onder andere regelmatig worden beoordeeld op symptomen van hartfalen middels een in dit centrum ontwikkelde methode. Hiermee worden de dieren nauwlettend in de gaten gehouden en kan efficiënt worden ingegrepen wanneer de humane eindpunten worden bereikt. De beoordeelde symptomen zijn tevens ook van toegevoegde waarde bij het interpreteren van de onderzochte effecten.

Wij achten het van belang te benoemen dat slechts een klein gedeelte van de proefdieren blootgesteld zal worden aan het eindstadium hartfalen en de hierbij horende welzijnsaantasting. Het grootste deel van de proefdieren zal in een vroegere fase worden geofferd om de gestelde onderzoeksvragen te beantwoorden.

[REDACTED]

---

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

- De dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
  - De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met speeltjes. De dieren worden gehuisvest in een licht- en geluidsarme omgeving.
  - Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het [REDACTED]
-

[REDACTED]

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

- [REDACTED]

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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



Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie). In de tijd ontwikkelen deze dieren hypertrofie en hartfalen, er wordt op gelet dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreden d.m.v. adequate monitoring van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen volumebelasting.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van [REDACTED] hart falen. Bij [REDACTED] ( [REDACTED] ) worden dieren geofferd

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- [REDACTED]
- [REDACTED]

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

Op basis van de hoeveelheid dieren die bij chirurgisch aangelegde druk- en/of volumebelasting de kans loopt om de criteria te halen, verwachten wij dat dit bij deze groep ook 20% zal zijn.

### K. Classificatie van ongerief

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

matig

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Derhalve is het doden van de proefdieren essentieel.

Tevens is de hartcatheterisatie een essentieel onderdeel van het experiment. Deze ingreep is dodelijk voor de proefdieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Redacted]  
[Redacted]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134  
**Bijlagen**  
2

Datum 15-06-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 juni 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is [Redacted] 2015134. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED] [REDACTED]  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: [REDACTED] [REDACTED]

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2015  
Geplande einddatum: 1 mei 2020  
Titel project: Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp  
Titel niet-technische samenvatting: Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 741,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Overige bijlagen:

Melding Machtiging

Er zijn geen bijlagen ontvangen.

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

[REDACTED]

Datum:

8 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Redacted]  
[Redacted]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134  
**Bijlagen**  
2

Datum 15-06-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 15 juni 2015  
Vervaldatum: 15 juli 2015  
Factuurnummer: 201570134

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag [Redacted] 2015134	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Redacted]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134

Datum  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Op 5 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp met aanvraagnummer [Redacted] 2015134. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 31 juli 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[REDACTED]  
p/a  
[REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED] 2015134

Datum  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Op 5 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp met aanvraagnummer [REDACTED] 2015134.

**DEC advies gevraagd**

Uw aanvraag is naar [REDACTED] gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Uw aanvraag wordt door een andere dan de door u aangegeven DEC van een advies voorzien. nvt, is al advies aanwezig

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 4 juni 2015 16:32  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** DEC advies nieuw project (interne [REDACTED] [REDACTED])  
**Bijlagen:** [REDACTED] CCD projectvoorstel.pdf; [REDACTED] NTS form V5.pdf; [REDACTED] bijlage volgnummer 1.pdf; [REDACTED] bijlage volgnummer 2.pdf; [REDACTED] bijlage volgnummer 3.pdf; [REDACTED] bijlage volgnummer 4.pdf; [REDACTED] bijlage volgnummer 5.pdf; DEC advies [REDACTED].pdf

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project [REDACTED] [REDACTED]. Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlages, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de [REDACTED]

[REDACTED]

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [REDACTED] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. [REDACTED] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED]
2. Titel van het project: Evaluatie en behandeling van falen van de rechter hartkamer.
3. Titel van de NTS: Evaluatie en behandeling van falen van de rechter hartkamer
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
  - [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **08-04-2015**
  - aanvraag compleet **08-04-2015**
  - in vergadering besproken **16-04-2015**
  - anderszins behandeld **20-04-2015, 07-05-2015, 12-05-2015, 02-06-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot **20-4-2015 tot 26-05-2015**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag **7-05-2015, 26-05-2015**
  - advies aan CCD **04-06-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum **12-05-2015**
  - Plaats: [REDACTED]

- Aantal aanwezige DEC-leden: **2**
- Aanwezige (namens) aanvrager: **PI en promovendus**
- Strekking van de vraag / vragen:  
**Het concept mist duidelijke fasering, ijkmomenten en onderbouwing van het nut tot gebruik van 2 diersoorten, nl. rat en muis.**
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
**vragen zullen worden uitgewerkt in nieuwe versie.**  
**Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **20-04-2015, 07-05-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:  
**Het concept mist duidelijke fasering, ijkmomenten en onderbouwing van het nut tot gebruik van 2 diersoorten, nl. rat en muis.**
- Datum antwoord **01-05-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
**vragen zullen worden uitgewerkt in nieuwe versie.**  
**De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

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

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja.**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag: **ja.**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **ja.**

4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **n.v.t.**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

**X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Immers uitbreiding van het inzicht in de pathofysiologische oorzaken van rechterkamerfalen is essentieel teneinde te komen tot vroegdiagnostiek en behandelmogelijkheden van deze maatschappelijk zeer relevante aandoening.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project, waarbij zoveel als mogelijk wordt voortgebouwd op voorafgaande resultaten uit *in vitro* onderzoek en fasering een belangrijk uitgangspunt is in het projectvoorstel.
5. Ten aanzien van vermindering van het proefdiergebruik wordt daar waar mogelijk de rat gebruikt teneinde de uitval zoveel als mogelijk te beperken.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen, maar van belang is dat voorafgaand *in vitro* onderzoek een belangrijk uitgangspunt is van het projectvoorstel.
8. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie op het gebied van de voorgestelde dierproeven en waar relevant wordt samenwerking gezocht.
9. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting maakt onderdeel uit van de aanvraag.

## D. Ethische afweging

De DEC ziet het belang van uitbreiding van het inzicht in de pathofysiologische oorzaken van rechterkamer falen teneinde te komen tot vroegdiagnostiek en behandelmogelijkheden van deze maatschappelijk zeer relevante aandoening. Alhoewel wordt voortgebouwd op voorafgaande resultaten uit *in vitro* onderzoek is het gebruik van proefdieren in onderhavig onderzoek onvermijdelijk en wordt de keuze voor de inzet van beide diersoorten, alsmede de fasering en ijkmomenten, goed onderbouwd. Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten heeft de DEC de conclusie kunnen trekken dat het geplande onderzoek ethisch toelaatbaar is.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

**Dit besluit is unaniem door de DEC genomen.**

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 juni 2015 16:14  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag om aanvullende informatie betreffend dossier [REDACTED] 2015134  
**Bijlagen:** aanvullende informatie [REDACTED] 2015134.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag "Evaluatie en behandeling van falen van de rechterhartkamer". Met dossiernummer [REDACTED] 2015134.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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



[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 juni 2015 16:18  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag om aanvullende informatie betreffend [REDACTED] 2015134

Geachte meneer [REDACTED],

Wij hebben aan onderzoeker [REDACTED] en aanvrager [REDACTED] de vraag gesteld of zij betreffend dossier [REDACTED] 2015134 of zij 1 of beide geslachten dieren kunnen gebruiken voor hun onderzoek "evaluatie en behandeling van falen van de rechterhartkamer" en de keus voor 1 geslacht kunnen onderbouwen.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted address information]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centrale  
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 24 juni 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 5 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie en behandeling van falen van de rechter hartkamer" met aanvraagnummer [Redacted] 2015134. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

**Datum**

24 juni 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

██████████ 2015134



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

## Bijlage 1

### Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Dossier [REDACTED] 2015134

“Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hypertensie”

Gevraagde aanvullende informatie in schrijven CCD, d.d. 24-06-2015:

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt U toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt U dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Antwoord:

In de bijlages beschrijving dierproeven beschrijven wij het gebruik van mannelijke ratten.

De voorgestelde diermodellen voor rechter ventrikel belasting en voor PAH werden eerder klinisch en hemodynamisch uitgebreid gekarakteriseerd in mannelijke ratten en niet in vrouwelijke ratten. Daarom hebben wij ten behoeve van standaardisatie en homogeniteit gekozen voor het gebruik van mannelijke ratten in ons onderzoek.

In de gebruikte modellen zijn geen gegevens bekend over sexe-Invloed op de inductie van ziekte en/of de ziekte-respons, en bestaan geen vergelijkende data tussen mannelijke en vrouwelijke ratten.

In het kader van het terugdringen in de toekomst van het aantal dieren in voorraad gedood, zou het gebruik van beide geslachten wellicht mogelijk zijn, echter dan dient eerst in een vergelijkende studie onderzocht te worden of sexe-verschillen bestaan in deze dier-modellen ten aanzien van ziekte-inductie en ziekte-respons.

[REDACTED] 09-07-2015

Namens [REDACTED], aanvragers  
[REDACTED]

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 7 juli 2015 15:03  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** FW: vraag om aanvullende informatie betreffend dossier [REDACTED] 2015134  
**Bijlagen:** aanvullende informatie [REDACTED] 2015134.pdf

Geachte mevrouw [REDACTED]

Bij deze de email die op 24.06.2015 naar [REDACTED] is gestuurd.

Graag ontvangen we zsm een antwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

*Uitvoeringsexpert*

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

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

T: 0900 2800028

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

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 juni 2015 16:14  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag om aanvullende informatie betreffend dossier [REDACTED] 2015134

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag "Evaluatie en behandeling van falen van de rechterhartkamer". Met dossiernummer [REDACTED] 2015134.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Barcode]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134  
**Bijlagen**  
2

Datum 05-08-2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 juni 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is [Redacted] 2015134. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding Bijlagen



### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED] [REDACTED]  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: [REDACTED] [REDACTED]

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2015  
Geplande einddatum: 1 mei 2020  
Titel project: Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp  
Titel niet-technische samenvatting: Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**




De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats:   
Datum: 8 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Barcode]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134  
**Bijlagen**  
2

Datum 05-08-2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 5 augustus 2015  
Vervaldatum: 4 september 2015  
Factuurnummer: 201570134

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag [Redacted] 2015134	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[Redacted]  
p/a  
[Redacted]  
[Redacted]  
[Redacted]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[Redacted] 2015134  
**Bijlagen**  
2

Datum 05-08-2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,  
Op 5 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Evaluatie en behandeling van hartfalen bij aangeboren hartafwijkingen en pulmonale hyp met aanvraagnummer [Redacted] 2015134. Uw aanvraag is helaas niet compleet. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Welke informatie nog nodig**

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

#### **Aanvraagformulier niet volledig**

Het aanvraagformulier is niet volledig ingevuld. Hierbij ontvangt u een kopie van het aanvraagformulier retour met daarop aangegeven op welk onderdeel of op welke onderdelen een aanvulling nodig is. Graag ontvangen wij het volledig ingevulde formulier van u terug.

#### **Bijlagen**

Uw aanvraag gaat niet vergezeld van een projectvoorstel en niet-technische samenvatting. Graag ontvangen wij deze verplichte bijlagen.

#### **Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kunnen wij uw aanvraag niet in behandeling nemen.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hiervoor het formulier dat u bij deze brief krijgt. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, zullen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

**Wanneer een beslissing**

Zodra uw aanvraag compleet is, krijgt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding Bijlagen

# Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.

Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

## 1 Uw Gegevens

Naam instelling: [REDACTED]

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: [REDACTED] 2015134

## 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlagen in.

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

### **3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

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





**Datum**  
29 juli 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED] 2015134

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

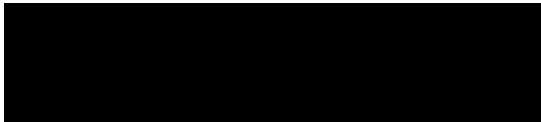
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en woonplaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 01-08-2015 tot en met 01-05-2020, voor het project "Evaluatie en behandeling van falen van de rechterhartkamer" met aanvraagnummer AVD105002015134, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat de CCD het cumulatieve ongerief van de dieren welke 2 maal binnen 1 week een chirurgische ingreep onder algehele anesthesie ondergaan uit bijlage 3.4.4.4 hoger classificeert: namelijk als ernstig in plaats van matig.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is principal investigator

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11-06-2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 05-06-2015
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 05-06-2015
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 05-06-2015
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 09-07-2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Drukbelasting CHA	Ratten en muizen	400 rat 660 muis	matig	
Volume belasting CHA [REDACTED]	Ratten en muizen	400 rat 640 muis	matig	
Volume belasting CHA [REDACTED]	Ratten en muizen	400 rat 220 muis	matig	
Gecombineerde druk- en volume belasting van de rechter ventrikel CHA	Ratten	400	ernstig	De ratten die tweemaal in een week chirurgie onder algehele narcose ondergaan worden geregistreerd met ernstig ongerief.
Genetisch gemodificeerde muizen	Muizen	640	matig	
Pilot studie tbv het gebruik van beide geslachten	Ratten / muizen			Zoveel vrouwelijke dieren als nodig om een pilot studie tbv van het gebruik van beide geslachten uit te voeren. In afstemming met de IVD

**Datum**  
29 juli 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED] 2015134

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 01-05- 2021 plaatsvinden.

**Voorwaarden**

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

In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel / geïntegreerd aan de eerst studie met mannelijke dieren worden uitgevoerd.

Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden worden in alle volgende dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood.

De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste pilot onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

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

Datum  
29 juli 2015

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
2015134

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **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 blijven schade

**Datum**

29 juli 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

[REDACTED] 015134

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk April 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED]
2. Titel van het project: Evaluatie en behandeling van falen van de rechter hartkamer.
3. Titel van de NTS: Evaluatie en behandeling van falen van de rechter hartkamer
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
  - [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **08-04-2015**
  - aanvraag compleet **08-04-2015**
  - in vergadering besproken **16-04-2015**
  - anderszins behandeld **20-04-2015, 07-05-2015, 12-05-2015, 02-06-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot **20-4-2015 tot 26-05-2015**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag **7-05-2015, 26-05-2015**
  - advies aan CCD **04-06-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum **12-05-2015**
  - Plaats: [REDACTED]

- Aantal aanwezige DEC-leden: **2**
  - Aanwezige (namens) aanvrager: **PI en promovendus**
  - Strekking van de vraag / vragen:  
**Het concept mist duidelijke fasering, ijkmomenten en onderbouwing van het nut tot gebruik van 2 diersoorten, nl. rat en muis.**
  - Strekking van het (de) antwoord(en):  
**vragen zullen worden uitgewerkt in nieuwe versie.**  
**Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.**
8. Correspondentie met de aanvrager
- Datum **20-04-2015, 07-05-2015**
  - Strekking van de vraag / vragen:  
**Het concept mist duidelijke fasering, ijkmomenten en onderbouwing van het nut tot gebruik van 2 diersoorten, nl. rat en muis.**
  - Datum antwoord **01-05-2015**
  - Strekking van het (de) antwoord(en):  
**vragen zullen worden uitgewerkt in nieuwe versie.**  
**De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja.**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag: **ja.**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **ja.**



4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **n.v.t.**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

**X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Immers uitbreiding van het inzicht in de pathofysiologische oorzaken van rechterkamerfalen is essentieel teneinde te komen tot vroegdiagnostiek en behandelmogelijkheden van deze maatschappelijk zeer relevante aandoening.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project, waarbij zoveel als mogelijk wordt voortgebouwd op voorafgaande resultaten uit *in vitro* onderzoek en fasering een belangrijk uitgangspunt is in het projectvoorstel.
5. Ten aanzien van vermindering van het proefdiergebruik wordt daar waar mogelijk de rat gebruikt teneinde de uitval zoveel als mogelijk te beperken.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen, maar van belang is dat voorafgaand *in vitro* onderzoek een belangrijk uitgangspunt is van het projectvoorstel.
8. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie op het gebied van de voorgestelde dierproeven en waar relevant wordt samenwerking gezocht.
9. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting maakt onderdeel uit van de aanvraag.

## **D. Ethische afweging**

De DEC ziet het belang van uitbreiding van het inzicht in de pathofysiologische oorzaken van rechterkamer falen teneinde te komen tot vroegdiagnostiek en behandel mogelijkheden van deze maatschappelijk zeer relevante aandoening. Alhoewel wordt voortgebouwd op voorafgaande resultaten uit *in vitro* onderzoek is het gebruik van proefdieren in onderhavig onderzoek onvermijdelijk en wordt de keuze voor de inzet van beide diersoorten, alsmede de fasering en ijkmomenten, goed onderbouwd. Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten heeft de DEC de conclusie kunnen trekken dat het geplande onderzoek ethisch toelaatbaar is.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

**Dit besluit is unaniem door de DEC genomen.**





## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10
		Postbus	9101
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 15 . 07 . 2015
- Einddatum 15 . 07 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

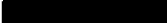
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

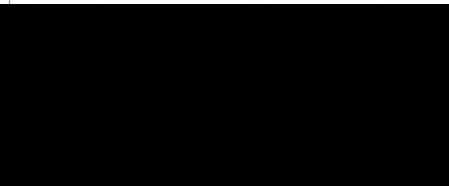
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 15 - 06 - 2015

Handtekening 



**Form  
Project proposal**

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients

## 2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
		<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
		<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
		<input type="checkbox"/> Higher education or training



---

 Forensic enquiries

---

 Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

---

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

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

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common form of pediatric malignancies (1). Despite the fact that with current treatment protocols approximately 85% of all cases can be cured, a sustainable fraction of patients still relapses and succumbs to the disease (2). In addition, survivors of childhood cancer face severe treatment related morbidities, including cardiotoxicity and secondary malignancies (1,2). Together, this calls for improvement of current therapy schemes in order to improve survival while reducing toxicity. A currently implicated method of refinement is risk adjusted therapy. Children with ALL are stratified into risk groups based on diagnostic features (i.e. age and cytogenetics) as well as initial response to therapy (2). Furthermore, the characterization of the tumor genome has allowed the identification of genetic lesions that are predictive of outcome (3-5). Based on this profile, children with a predicted low risk of relapse are treated with a reduced intensity scheme while children suffering from a tumor with a high risk profile are treated with an high intensity scheme, that may include bone marrow transplantation, a treatment associated with high treatment related mortality.

Despite our increasing understanding of tumor genetics and its implications for risk prediction, with the exception of a few markers (like BCR-ABL1), current therapy protocols are not tailored based on the individual tumor properties (6,7). This is largely because it is currently unknown how mutations in the affected genes contribute to tumor development and in selected cases promote relapse formation. This will be addressed in our studies.

In a close collaboration between [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] and [REDACTED], we have studied tumor cell genetics and identified several genes that are predictive of poor outcome. For example, we and others have identified genetic defects and mutations in the tumor suppressor gene *IKZF1* as a very strong predictor of relapse in children with B cell precursor ALL (BCP-ALL) (8, 9). In addition, the analysis of a large set of patients has allowed the identification of genetic interactions that may contribute to tumor development and/or therapy failure. For example, co-occurrence of *BTG1* deletions (10) within specific subgroups (for example: characterized by an *IKZF1* deletion or defined by a BCR-ABL1-like expression profile) predicts an inferior survival outcome (6,11). We aim to acquire in-depth understanding on how these genetic lesions affect cell behavior and contribute to leukemogenesis and/or the development of therapy resistance, an essential property of relapse prone tumors. Although the biochemical characterization, combined with the modeling of these mutations in mutations in cell lines has aided in our understanding of leukemic cell biology, animal experiments are required to complement these studies due to technical and biological limitations of the in vitro work. For example, the genetic composition of currently available cell lines limits the use for studies on genetic interactions. In addition, the culture of mammalian hematopoietic cells, in particular leukemic cells remain challenging and is only feasible for a highly selected subset (tumor) cells. Furthermore, processes like clonal evolution and selection of relapse-prone tumor cells can only be addressed by in vivo studies.

#### Literature:

- (1) Inaba,H et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2013;381(9881): 1943-55.
- (2) Ching-Hon Pui et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how to we get there? *Blood* 2012;120:1165-1174.
- (3) Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122(10):3398-406.
- (4) Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2013;50(4):314-24.
- (5) Hogan LE, Meyer JA, Yang J, *et al.* Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood* 2011;118(19):5218-26.
- (6) Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(11):1005-15.

(7) Pui CH et al. Biology, Risk stratification, and Therapy of Pediatric acute leukemias: An Update. JCO 2011,29 (5):551-565

(8) Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, *et al.* IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. Leukemia 2010;24(7):1258-64.

(9) Mullighan CG, Su X, Zhang J, *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2009;360(5):470-80.

(10) van Galen JC, Kuiper RP, van Emst L, *et al.* BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2010;115(23):4810-9.

(11) Tijchon E. et al. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. Leukemia 2013; 27(3) 541-52.

### 3.2 Purpose

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

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

We aim to obtain a detailed understanding of the genetic interactions between tumor suppressor genes and oncogenes and the molecular mechanisms by which our genes of interest contribute to the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as the outgrowth of drug-resistant clones in ALL. With this research project we would like to investigate a broader set of candidate genes that are implicated in pediatric ALL in a biological relevant model system to assess in which manner (combinations) of these genes contribute to leukemia outgrowth and chemotherapy resistance.

████████████████████ has elaborate experience with animal studies (18 approved DEC applications in the past 5 years) and has the appropriate infrastructure of experienced technicians, PhD students, postdocs and project leaders within the field of cancer biology to conduct the proposed research project. This project is part of an ongoing research effort aimed at investigating the molecular basis of pediatric leukemia and therapy resistance. Our previous studies have identified new genetic interactions between tumor suppressor genes that will have a significant impact in the field of leukemia biology, where we identified that Btg1

loss in combination with haploinsufficiency of *Ikzf1* leads to accelerated onset of leukemia in mice and promotes therapy resistance. We would like to further validate these findings using humanized mouse models, xenotransplantations and extend these studies to other candidate genes.

---

### **3.3 Relevance**

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

---

Deeper understanding of genetic mutations that contribute to leukemia and therapy resistance will provide us a rationale for (i) a better identification of patients at risk of developing therapy resistance and to offer these patients tailored chemotherapy strategies in ALL using currently available therapy schemes and (ii) characterization of candidate target molecules for specific therapies as alternative treatment modalities. For example, data from our lab indicate that deletions in the *IKZF1* gene confer resistance towards glucocorticoid-induced apoptosis in normal and leukemic B cells. As glucocorticoids are keystone drugs in the treatment of ALL, knowledge about the initial treatment response would be of great value. We also have first indications that other mutations could have a direct impact on chemotherapy sensitivity and identification of novel genetic markers would help to identify patients who need stronger treatment protocols. Next to this, deeper understanding of the genetic background would also help to identify patients who will be cured even with lower doses of chemotherapy. Despite the fact that approx. 85% of all patients are cured from leukemia, life-long side effects due to the chemotherapy treatment remain a serious problem. Therefore, identifying patients that can be cured with milder chemotherapy regimens is of utmost importance.

In addition to the translational aspect of this work, these studies will aid significantly to our understanding of (tumor) cell biology, which may be translated to other fields of research. For a long time, clinical risk stratification was mainly based on major chromosomal aberrations: However, with the rise of next-generation sequencing during the last decade, we are now able to identify single gene deletions which could play an important role in cancer development. Our finding will therefore not only have a major impact in the field of leukemia research (scientific relevance), but may also improve quality of life for the cancer patient (social relevance).

---

### **3.4 Research Strategy**

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

---

---

The proposed animal experiments will complement our studies where in vitro work faces its limitations. In this project we have divided our procedures into two experimental groups:

-Xenotransplantations will be used to study the properties of human cells (both manipulated normal cells as well as tumor material) in vivo.

Transplantations of human cells with (combinations of) genetic lesions of interest into mice will help us to identify genetic lesion which confer engraftment (and thereby survival) advantage in an in vivo context. Next to this, primary ALL samples, which barely grow in an in vitro setting, can be expanded by xenotransplantation into immunodeficient mice. These xenotransplantations will be performed with immunodeficient mice. In established xenotransplant models chemotherapy responses will be determined to investigate the impact of certain genetic lesions on therapy resistance.

-Genetically modified mouse models will be used to study the effects of induced genetic lesions in a defined genetic background. In a primary leukemia, it is hard to study the effect of (combinations of) specific genes as the complex genetic background is often poorly understood, and could mask the contribution of candidate genes towards disease development and therapy resistance. To eliminate this genetic noise, induction of genetic lesions in a murine model is the best way to study genetic aberrations in a defined genetic setting. Interesting (combinations of) genetic lesions will be studied in knockout and transgenic mice based on several criteria: Novel findings in the scientific community, results of in vitro experiments and the outcome of the xenotransplantations. The mouse models are therefore also highly suitable to investigate the impact of therapy, and assess which genetic defects contribute to therapy resistance.

---

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

---

To study the contribution of genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we make use of several approaches:

**1. Xenotransplantations of (1.1) primary human ALL patients samples (1.2) genetically modified human hematopoietic stem cells/progenitors cells and induced pluripotent stem (iPS) cells, or (1.3) genetically modified human cell lines into immunodeficient mice.**

A major hurdle in studying primary human ALL samples is the inability to grow and expand these cells in vitro. The current golden standard are xenotransplantations of human ALL samples into immunodeficient mice.

1.1 Over the last years, our lab created an ALL patient sample collection/library consisting of cells derived from primary leukemia/lymphoma patients. These include combinations of diagnosis – relapse samples of the same patient. Analysis of the tumor genome, performed both for diagnostic as well as research purposes will provide us with the essential information about the genetic context. We will use serial xenotransplantations to expand the number of cells for ex vivo analysis. In addition, we will study the in vivo behavior of these cells, including drug resistance analysis and clonal evolution analysis.

1.2 To study the effect of commonly found leukemia-associated genetic defects, we will transduce human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells differentiated towards the hematopoietic lineage with lenti- or retroviruses encoding over expression of our genes of interest. Alternatively, we will use CRISPR/Cas9 based knockout or shRNA mediated knockdown to reduce expression of genes of interest, either alone or in combination with over expression of genes of interest. The transduced cells will be transplanted into immunocompromised mice and analyzed. This analysis will include (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic intervention, both in vivo and ex vivo.

1.3 Because for some studies, the use of primary human cells (normal or leukemic) is limited by technical challenges, we will address some questions by using human leukemia or lymphoma cell lines. Similar to the approach as addressed above in 1.2, will mimic mutational events by retro or lentivirally induced expression or knockdown/knockout of relevant (combinations of) genes. Alternatively or in addition, we will introduce genome-scale CRISPR gain-of-function or loss-of-function libraries to identify genes that are essential for the oncogenic potential and/or drug sensitivity of these cells. We will transplant these manipulated cells and/or non-manipulated control cells into immunocompromised mice and study the relevant phenotype of these cells. This analysis will include but will not be limited to (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic intervention.

## **2. Genetic modeling of genetic aberrations relevant for leukemia/lymphoma development in a murine model**

To study and define the genetic interactions of candidate genes during leukemia development and chemotherapy resistance in a genetically defined model, the use of knockout mouse models is of great value.

2.1 For example, the integration of tumor genetics with survival data showed that the co-occurrence of hemizygous loss of both IKZF1 and BTG1 results in a significantly worse relapse-free and overall survival. How these and other genetic interactions translate into a different behavior of tumor cells is currently unknown. We have previously shown that these genetic interactions can be faithfully recapitulated in a murine background. The advantage of this approach over the use of human cells as described above, is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. We propose the following experiments to study the effect of genetic interactions: To study the effect of the introduction leukemia/lymphoma associated lesions in a defined genetic background, we will breed mice with a specific genetic alteration (including but not limited to disruption of the *Btg1* and *Ikzf1* genes or expression of transgenic oncogenes like BCR-ABL1 or c-Myc). We will analyze the contribution of a single gene defect as well as a combination of defects by intercrossing of these mice. We will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention). In addition, we will study the contribution of the induced genetic lesions to normal hematopoietic development. We will assay this using relevant assays, including but not limited to ex vivo analysis of cell surface marker expression, colony forming capacity and gene expression. Furthermore, we will evaluate cell intrinsic effects of these genetic lesion(s) by transplanting these cells (both pre-leukemic and tumor cells) into syngenic mice without the genetic lesion(s). As described above, we will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention).

2.2 To study the effects of modulation of gene expression on cells that have a genetic defect (as described in 2.1), we will introduce mutational events by retro- or lentiviral induced expression or knockdown/knockout of relevant (combinations of) genes in hematopoietic cells isolated from mice that exhibit a genetic defect. Alternatively or in addition, we will introduce genome-scale CRISPR gain-of-function or loss-of-function libraries ex vivo into cells isolated from mice to identify genes that are essential for the oncogenic potential and/or drug sensitivity of these cells. We will transplant these manipulated cells and/or non-manipulated control cells into CD45.1 mice ( and study the relevant phenotype of these cells. This analysis will include but will not be limited to (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic

intervention. Alternatively, we will assay cell behavior in vivo using relevant assays, including but not limited to analysis of cell surface marker expression, colony forming capacity, gene expression, and sensitivity towards drug induced cell death. The amount of mouse models that will be used will be determined by our scientific interest and financial support. In the past five years our research has been supported by several grants of [REDACTED] and [REDACTED]. Our estimate is that at any given time during the project between 3 to 6 different genetic mouse models will be investigated by our research group and about 30-60 xenotransplants will be followed in time. On average we expect that about 20% of the animals may succumb to leukemia in the genetic mouse models and about 50% in the xenotransplants.

---

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

Each of the proposed experiments is designed to address specific parts of the research questions and will be complementary to the other in vivo and in vitro experiments.

We will use xenotransplantations to study the effect of specific leukemia-associated genes on tumor cell behavior and therapy responses. Particularly the studies on clonal evolution that address the process of selection of subclones that are present in the primary tumor during in vivo tumor growth as well as during chemotherapeutic intervention cannot be performed in vitro. This approach will both require as well as benefit from the presence of the genetically diverse tumor landscape, both within a single tumor as well as between different tumors.

Particularly, to study the effect of individual (combinations of) mutations requires the use of a defined genetic background, as is available in the murine models that are described in section 2 of the research outline. This allows the analysis of the impact of isolated mutations on hematopoiesis, tumor development and therapy resistance, without the complications of genetic diversity. Together, the proposed animal experiments, supported by the various in vitro experiments and genetic analyses, will yield a better understanding on how combinations of genetic mutations contribute to tumor cell development and therapy resistance. Since many molecular pathways can be modified by currently available clinical grade small molecule compounds, acquired insight in tumor cell behavior may be rapidly translated into new therapeutic strategies in the clinic.

The outcome of each of the two parts of the application (xenotransplantation and genetic modeling) will complement each other and together will have a significant impact on our knowledge of childhood leukemia and chemotherapy responses. Through



ongoing advances of knowledge in the field of childhood leukemia we will integrate these new findings with our obtained results to achieve our main objective.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Xenotransplantations
2	Genetic modelling

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Xenotransplantations</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Xenotransplantations
Serial number	Type of animal procedure					
1	Xenotransplantations					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

Based on our current research interest and ongoing developments in the leukemia field for the next 5 years, we will xenotransplant primary human hematopoietic and iPS cells, primary ALL samples or leukemia cell lines with relevant genetic profile(s) into immunodeficient mice. The primary outcome parameters will be: (i) engraftment of primary human cells after transplantation as assessed by blood sampling and flow cytometry (human cell surface marker) and post-mortem tissue analyses (in vitro studies); (ii) leukemia development as evidenced by signs of illness, e.g. hunched posture, difficulties breathing, lack of physical activity; (iii) therapy response as measured by blood sampling and post-mortem tissue analyses. These parameters will provide sufficient information to address the objectives of our studies using primary human cells.

To keep the amount of animals as low as possible, in certain cases a small pilot experiment will be performed to assess the optimal amount of cells required to be injected for that type of xenotransplantation experiment to achieve optimal engraftment and in vivo outgrowth. Optimized cell counts will then be used in subsequent experiments. Furthermore, if sufficient information is available, statistics will be performed to assess the minimum amount of animals required to achieve required results.

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

---

For the animal procedures the following approaches will be taken:

1.1 Primary ALL samples: These cells, routinely frozen and stored in liquid nitrogen, will be thawed and prepared for intrafemoral (IF) or intravenous (IV) injection into immunodeficient mice. The amount of cells to be injected will vary between 100- 10E6 cells, depending on the type of ALL sample. The leukemic cells will be allowed to engraft for up to a period of 30 weeks. During this time period, blood will be sampled once a month to follow up the engraftment and the mice will be monitored for disease 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Subsequently, mice with clear signs of illness (leukemia) will be euthanized and engrafted tumor cells will be isolated for further molecular and functional studies.

1.2. Human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells differentiated towards the hematopoietic lineage will be transduced with lenti- or retroviruses encoding/targeting our genes of interest

(overexpression or shRNA/gRNA for loss of function). Subsequently, after validation of efficient viral transduction in the specific target cells, mice will be injected with the transduced cells and monitored as described in 1.1.

1.3 Human ALL cell lines will be transduced similar to the transduction procedure in 1.2 and these manipulated cell lines will be injected into immunodeficient mice and monitored as described in 1.1 and 1.2.

These approaches are standard techniques in the field of leukemia research and should provide us with the required information to address the main objective of our project. Primary outcome parameters for most of these transplanted cells will be leukemia disease in the absence or presence of additional chemotherapy treatment. In all cases mice with obvious signs of leukemia will be euthanized and affected organs will be removed for further cell biological and genetic studies. In general, transplanted mice will be followed for maximal 12 month for potential engraftment/disease development. The time period of engraftment highly depends on the leukemic subtype which was injected and the combinations of oncogenic drivers/tumor suppressors. Therefore, these parameters define the engraftment potential of a sample and there will be cases in which the time to engraftment is shorter or longer.

#### Radiation:

Hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) need physical space to grow in the bone marrow niche of a mouse. Therefore, all transplantations of normal bone marrow cells that have been virally transduced into murine hosts makes irradiation necessary for the cells to grow out.

Immunodeficient mice will only be lethally irradiated in case of transplanting primary hematopoietic stem cells, but not with primary human leukemia cells.

This means that only mice in 1.2 will undergo a prior irradiation to allow the (genetically manipulated) human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells to repopulate the bone marrow of irradiated mice.

---

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

---

Based on current experience with designing these studies, we provided a valid estimate of the number of animals needed over a time period of 5 years. For each individual experiment, provided there is sufficient information, we will perform a power calculation to assess the minimal amount of animals required to reach statistical significance. For this purpose, we consult with a biostatistician before conducting an experiment to ensure that we employ the appropriate calculation and include the correct amount of animals to achieve the desired result. We will consult published literature and experienced colleagues in the field for advice for those experiments where we cannot perform any statistical methods to assess the minimum amount of animals. For some

experiments, a pilot study will be performed to determine the optimal number of cells to engraft in a mouse and to get an overview about the general engraftment capacity of the human cells.

## B. The animals

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

The golden standard for xenotransplantation of human cells are immunodeficient mice, which display efficient engraftment capacity of normal hematopoietic and leukemic cells. These immunodeficient mice, such as NOD-scid IL2Rgamma-Null (NSG) mice, will be obtained from breeding pairs at the [REDACTED] or external commercial providers. The estimated number of immunodeficient mice for the proposed experiments is 1000 animals for the total period of 5 years.

[REDACTED] is planning to generate a primary ALL patient library representing high-risk and relapsed leukemia samples using xenotransplantation. We will transplant 3 mice per ALL sample of interest and will re-transplant the obtained ALL xenograft samples in a secondary transplant series (3 mice per secondary transplantation) in order to fully characterize engraftment capacity of these cells. We expect to transplant 50 leukemias of interest in the upcoming 5 years, leading to a total of  $50 \times 9 \text{ animals} = 450$  mice necessary for xenotransplantations of primary ALL samples (1.1). To study manipulated HSCs in 1.2 and their leukemic events after introduction of oncogenic drivers (For example, BCR-ABL1 in combination with loss of BTG1 function), we will need to engraft 10 mice per genetic combination to fully study their transforming capacity. In this setting, there will be 4 experimental groups (control, BTG1 loss, BCR-ABL1 expression and combined BCR-ABL1/BTG1) each with 10 mice. In total, we expect that we will investigate at least 10 genetic interactions, with an estimated total number of 400 mice.

In 1.3 established cell lines mimicking the contribution of oncogenic drivers in leukemia will be transplanted into mice. After elaborate validation of their growth capacity and chemotherapy responses in vitro, cells carrying interesting genetic combinations will be transplanted into mice and treated in some cases with chemotherapy. In this initial screening procedure we expect to transplant a total of 30 mice (3-5 animals per cell line/condition). Subsequently, for validation of specific targets, we expect that 20 mice will be required for this purpose.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Immunodeficient mice	[REDACTED] / Commercial suppliers	1000	2-10 months

---

**C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

1. Replacement:

A major hurdle in studying primary human ALL samples is the poor capacity to grow and expand these cells in vitro. To date the golden standard is xenotransplantation of human ALL samples into immunodeficient mice. Also, to study the development of leukemia in a physiologically relevant model, mice are the organism of choice as (1) their bone marrow provides a niche for human cells to grow and (2) the leukemic metastasis patterns in mice are similar to that of humans. To study the contribution of genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we also make use of in vitro experiments which help to lower the amount of mice necessary to answer the research questions. However, several aspects of the cancer biology cannot yet be studied in tissue culture and therefore, murine models are crucial to understanding the impact of genetic lesions of interest on disease development in a living organism.

## 2. Reduction:

The estimated number of animals is based on our current experience with designing these studies. We consult with a biostatistician prior to conducting a study to ensure that we are using a sufficient number of animals to achieve the desired result. Based on developments in the scientific field during the next 5 years, and our own experience from in vitro experiments in human leukemic cell lines, we will xenotransplant primary patient samples with relevant genetic profiles into immunodeficient mice. Given the complex requirements for growth of these primary human cells, we are dependent on the use of immunodeficient mice to investigate the properties of these cells with respect to leukemia outgrowth and therapy resistance. For each specific genetic lesion, we will initially determine the lowest amount of cells capable of inducing leukemia formation in the wild-type (WT) control setting. Therefore, a pilot experiment will be performed with 4 mice injected with 100,000 cells. Given the strong penetrance of the leukemia phenotype under standard conditions (injection of  $10^6$  cells), 4 mice will be sufficient to assess time to leukemia. This experiment will provide insight into the amount of cells required to induce leukemia in the recipient mice using wild-type control cells from patients or control cell lines.

## 3. Refinement

Immunodeficient mice will be kept in a protected environment to reduce the risk of infection. They will be housed with appropriate litter, nesting material and nest boxes. Xenotransplantation and radiation treatments will cause some adverse effects. If animals get infections or become seriously ill, they will be euthanized. Mice will be monitored for signs of disease on a daily base by animal caretakers trained to recognize animal discomfort. In addition, as leukemia can be detected in the blood of a living animal by controlling blood samples for increased numbers of circulating tumor cells, prior to onset of clinical signs. Therefore, blood will be taken from mice 1-2 times a month to screen for early disease onset of leukemia.

---

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

Mice will be monitored for the first signs of leukemia on a daily base (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Furthermore, mice will be housed under sterile conditions and will be monitored by trained facility members. Also, mice will preferentially be housed together with litter mates or at least other mice. Also, housing conditions provide nesting possibilities for the mice in the cage. As soon as any signs of disease or discomfort are detected (humane endpoints), mice will be euthanized to prevent more discomfort. In general for leukemia this will be within 1 week after the mice show detectable weight loss.

To prevent any effects on the environment, all cells used in the xenotransplantations are cultured and prepared under ML-II conditions, and the animals are housed in DM-II facilities.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

**Not applicable**

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

### G. Location where the animals procedures are performed

---

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

---



---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

---

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

---

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

---

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

---

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

---

Immunodeficient mice are prone to infections. In the experimental group, side effects of radiation or the injection procedure could lead to same discomfort. Xenotransplantation and subsequent engraftment of human leukemic cells leads to development of leukemia and secondary disease in the mice due to metastasis. Transport from the breeding facility to animal laboratory could lead to mild stress for the animals. We will try to avoid single housing of mice, which could also lead to mild stress.

In general, signs of discomfort include continued body weight loss, dehydration, anorexia, hypothermia and lethargy. Others indicators of discomfort in the animals are piloerection or hunched postures.

Explain why these effects may emerge.

---

Mice that are used for xenotransplantations are immunodeficient and therefore more susceptible to infections due to lack of immune cells. Injection of leukemic cells will lead to leukemic infiltration into organs, and the optional treatment with chemotherapeutic drugs may cause side effects.

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

---

Mice will be anesthetized during intrafemoral injections by isoflurane inhalation to prevent discomfort.

██████████ at ████████ under sterile conditions using the NSG protocol and daily monitoring of the mice by trained ████████ and ████████ personnel.

Next to this, leukemias can be detected in the living animal by examining blood samples for the presence of circulating cancer cells or changes in the cellular constituents of the blood. Increases in circulating tumor cells or changes in blood constituents can forecast the onset of clinical symptoms

#### **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Our primary criterium is the development of signs of leukemia, defined by weight loss, respiratory problems, behavioral changes, changes in posture or fur or a bloated belly.

For the mice which do not show any signs of leukemia at the end of the monitoring period of 52 weeks, all mice of the experimental group will be sacrificed.

Next to this, diseases which are not related to the experimental procedure (Infection, disease to to inbred) are considered and are defined as human endpoints. In general, as soon as mice present with signs of discomfort that are considered to reach general humane endpoints, mice will be sacrificed.

In general, all mice will be euthanized when reaching scientific endpoints and/or humane endpoints.

---

Indicate the likely incidence.

---

Potentially, we expect the mice to show signs of leukemia after xenotransplantation. The frequency of leukemia (engraftment of human cells in the mouse) strongly depends on the aggressiveness of the tumor cells, which is defined by the genetic composition of the (combinations of) genetic lesions in the cells.

On average we expect that about 50% of the animals may develop leukemia in the xenotransplants.

#### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The injection of leukemic cells is considered to be a procedure of mild discomfort. In total, the development of leukemia (expected in 50% of the animals), Irradiation and the possible side effects of chemotherapy will lead to moderate discomfort.

For the xenotransplantation,

Group 1.1: No irradiation, 50% of 450 animals will develop leukemia= 225

Group 1.2: Irradiation= 400

Group 1.3 No irradiation, 50% of animals will develop leukemia= 50

Total amount of animals that will experience moderate discomfort:  $675/1000 = 68\%$  (32% mild discomfort)

## **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Hematopoietic cells (normal and leukemic) need to be isolated from lymphoid organs, like bone marrow and spleen. Therefore, euthanasia is inevitable.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

---

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Genetic modelling</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Genetic modelling
Serial number	Type of animal procedure					
2	Genetic modelling					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Based on our current research interest and ongoing developments in the leukemia field for the next 5 years, we will model interesting (combinations of) genetic lesions in a murine model system.

The primary outcome parameters will be: (i) leukemia development as evidenced by signs of illness, e.g. hunched posture, difficulties breathing, lack of physical activity; (ii) therapy response as measured by blood sampling and post-mortem tissue analyses. These parameters will provide sufficient information to address the objectives of our studies to understand the impact of (combinations of) genetic lesions on leukemia development and chemotherapy resistance.

To keep the amount of animals as low as possible, for every transgene mouse model, a small pilot experiment will be performed to assess the frequency and timepoint of leukemia onset and potential unexpected side effects of the genetic alterations. Furthermore, if sufficient information is available statistics will be performed to assess the minimum amount of animals required to achieve required results.

---

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

For this part of the proposal, the following procedures will be performed:

1.1 We will breed mice with a specific genetic alteration (including but not limited to Btg1KO and Ikzf1Neo mice or expression of transgenic oncogenes like BCR-ABL1 or c-Myc). We will analyze the contribution of a single gene defect as well as a combination of defects by intercrossing of these mice. We will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention). In addition, we will study the contribution of the induced genetic lesions to normal hematopoietic development.

Mice from breedings with relevant genotypes at the age between 2-12 months will be euthanized by CO2 inhalation or cervical dislocation. Subsequently, lymphoid organs will be isolated and functionally analyzed in the laboratory for immunophenotype, chemotherapy responses, gene expression profiles and leukemic infiltration.

1.2 Murine hematopoietic progenitor cells isolated from WT mice or knockout mice will be harvested at the age of 2-4 month from euthanized mice (CO2 gas chamber or cervical dislocation). These cells will be transduced ex vivo with retro- or lentiviruses expressing genetic constructs of interest. Subsequently, after validation of viral transduction in the chosen cells, CD45.1 mice (B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyCrl) will be injected intravenously with the transduced cells. Cells will be allowed to engraft for a period 20 weeks. During this time period, mice will be monitored for disease 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Subsequently, mice will be euthanized and engrafted tumor cells will be isolated for further molecular and functional studies.

2. In vivo drug screening: Mice that develop spontaneous leukemia will be treated with chemotherapy. Chemotherapy will be injected at the appropriate site (eg. intravenous, intraperitoneal) and the intervals of induction treatment are depending on the chosen treatment. After a defined period, mice will be sacrificed and the total fraction of leukemic cells will be compared between control and treated animals.

These approaches are standard techniques in the field of leukemia research and should provide us with the required information to address the main objective of our project. Primary outcome parameters for most of these transgenic mice will be leukemia disease in the absence or presence of additional chemotherapy treatment. In all cases mice with obvious signs of leukemia will be euthanized and affected organs will be removed for further cell biological and genetic studies.

#### Radiation:

Hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) need physical space to grow in the bone marrow niche of a mouse. Therefore, all transplantations of normal bone marrow cells that have been virally transduced into murine hosts makes irradiation necessary for the cells to grow out.

In syngeneic settings, (mouse cells transplanted to mouse host) mice will be irradiated with a lethal dose to allow engraftment of primary hematopoietic progenitor cells mentioned in 1.2.

This means that only mice in 1.2 will undergo a prior irradiation to allow the engraftment of murine hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow) to repopulate the bone marrow of irradiated CD45.1 mice (B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyCrl)

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

---

Based on current experience with designing these types of studies, we estimated the number of animals needed over a time period of 5 years . We will consult with a biostatistician before conducting each study to ensure that we are using the minimum number of animals to achieve the desired result. A power calculation will be performed for every genetically modified mouse model to predict how many mice are necessary to answer the reserach question. Additionally, a pilot studie will be performed for every new genetic background of a mouse model to evaluate their capacity for disease development and potential discomfort.

## **B. The animals**

---

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

---

Mice are the organism of choice when studying leukemia development in a complex living being. Another advantage of using mouse models over human primary cells is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. The age of 2-12 month is choosen as leukemia development at this early stage can be correlated with the genetic modification of the mice, whereas leukemia development at a later age could be due to unrelated age-related effects. Genetically modified mice, such as Btg1 knockout and Ikzf1 knockout mice, will be obtained from breeding pairs at the [REDACTED] or external collaborators or commercial providers. The estimated number of mice for the proposed experiments are 3000 animals for a total period of 5 years based on elaborate experience with animal studies (18 approved DEC applications ) in our lab.

We expect to use 1000 mice for the maintenance of existing leukemia-prone genetic models and creation of novel mouse models (Interbreeding and retroviral/lentiviral transduction). The combinations of several genetic models need a elaborate breeding scheme including backcrosses to maintain genetic stability in tumor prone breedings.

Currently, we have 6 different genetic backgrounds (For example, Btg1<sup>-/-</sup> , Btg1<sup>-/-</sup> , Ikzf1<sup>+/-</sup> knockouts and combinations of them), which we aim to study further for leukemia development and functional characterization of leukemic cells in vivo and in vitro.



These genetic compound mice will be maintained over the next 5 years with at least three to five additional knockout strains, also in combination with different oncogenes using viral transductions.

For the ex vivo characterization of lymphocytes isolated from wild-type (control) mice and genetically modified mice, we expect to use at least 80 mice (for both developmental phenotypes and chemotherapy screenings) for each genotype. We are aiming to screen isolated lymphocytes for their immunological phenotype (Colony Assays, Flow Cytometry, etc..) and their response towards chemotherapeutic agents commonly used in ALL treatment such as prednisolone, dexamethasone (both glucocorticoids, key stone drugs in ALL treatment) and asparaginase (amino acid depleting agent). For example, to study the genetic interaction between two oncogenic mutants such as BTG1 and IKZF1 knockout animals, we will have 4 different genotypes in one experimental setting ( Control, Btg1-/-, Ikzf1+/- and compound Btg1-/-; Ikzf1+/- mice) which leads to 320 animals (4x80). To study a broad range of interactions (we expect to study 7 different interactions) we expect to need 320x6= 1920 mice over a time period of 5 years. All together, we expect to use 2000 mice for this type of experiments in the upcoming 5 years.

Based on the outcomes of the in vitro chemotherapy treatment of isolated cells, we are also planning to perform in vivo chemotherapy treatment on relevant genetically modified mice. The decision which treatment the mice will undergo is based on the observed phenotypes from our in vitro screening. For each chemotherapeutic drug, we want to study the early and late response of the mice towards the specific chemotherapy. For these types of experiments, we plan to use 20 mice for each experimental group. In total, this leads to an estimated number of 1000 mice for the in vivo chemotherapy experiments over a time period of 5 years.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	Breeding facility [redacted] / commercial suppliers/outside scientific collaborators	4000	2-12 month

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

##### 1. Replacement:

To study genetic interactions between genes of interest, it is necessary to make use of a genetically defined mouse model. The advantage of this approach over the use of human cells is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. To study the contribution of defined genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we also make use of in vitro experiments which help to lower the amount of mice necessary to answer the research questions. However, several aspects of cancer biology cannot be studied in a petridish and therefore, a murine model is crucial to understanding the impact of genetic lesions on disease development.

##### 2.Reduction:

The estimated number of animals is based on our current experience with designing these types of studies. A power calculation will be performed for each transgenic breeding to evaluate how many mice are minimally required to study leukemia development in order to obtain a statistically relevant result. In addition, we consult with a biostatistician before conducting a study to ensure that we are using the correct amount of animals to achieve the desired results.

##### 3. Refinement:

Immune-deficient mice will be kept in a protected environment to reduce the risk of infection. They will be housed with appropriate litter, nesting material and nest boxes. Chemotherapy and radiation treatments may cause some adverse effects. Doses are calculated to minimize side effects within the scientific objectives. If animals get infections or become seriously ill they will be euthanized. Mice will be monitored for signs of disease on a daily basis by facility members trained to recognize animal discomfort.

Next to this, as leukemia can be detected in the blood of a living animal by controlling blood samples for increased numbers of circulating tumor cells prior to the onset of any clinical signs. Therefore, blood will be taken from mice 1-2 times a month to screen for early signs of leukemia.

---

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

---

Mice will be monitored for signs of leukemia 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Mice will be housed under sterile conditions and will be monitored by trained facility members. Also, mice will preferentially be housed together with litter mates or at least other mice. Also, housing conditions provide nesting possibilities for the mice in the cage. As soon as any signs of disease or discomfort are detected (humane endpoint), mice will be euthanized to prevent further discomfort. To prevent any effects on the environment, all cells used in the xenotransplantations are cultured and prepared under ML-II conditions, and the animals are housed in DM-II facilities.

## **Repetition and Duplication**

---

### **E. Repetition**

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## **Accommodation and care**

---

### **F. Accommodation and care**

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

**F. Accommodation and care**

No

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

**G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

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

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

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

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

Intercrossed double or even triple transgenic mice potentially could show a higher frequency of leukemia development due to a synergistic interaction of the transgenes. (For example, intercrossing mice from a *Ikzf1*Neo background with the *Btg1*KO line will lead to an *Ikzf1*<sup>+/-</sup>; *Btg1*<sup>-/-</sup> mouse, which we observed to develop leukemia earlier than in the wild type control group).

In the experimental group, side effects of chemotherapy treatment could lead to discomfort. Also, transport from the breeding facility to animal laboratory could lead to mild stress for the animals. We are trying to avoid single housing of mice which could also lead to mild stress.

Similarly, side effects of radiation or the injection procedure could lead to discomfort. Xenotransplantation and subsequent engraftment of human leukemic cells leads to development of leukemia and secondary disease in the mice due to metastasis .

In general, signs of discomfort of the animals include continued body weight loss, dehydration, anorexia, hypothermia and lethargy. Others indicators for discomfort of the animals are piloerection or hunched postures.

Explain why these effects may emerge.

Knockout of genes with tumor suppressor function or expression of oncogenes could lead to a higher incidence of leukemia and more aggressive tumor infiltration. Also, optional chemotherapy could have side effects due to toxicity of the therapeutic agent. For the overall potential disease of animals, the inbreeding of mice to obtain genotypes of interest could lead to a higher incidence of disease and developmental problems in the mice.

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

Mice will be monitored on a daily base for signs of leukemia development or side effects of chemotherapy and will be euthanized before severe discomfort develops.

Next to this, leukemias can be detected in the living animal by examining blood samples for the presence of circulating cancer cells or changes in the cellular constituents of the blood. Increases in circulating tumor cells or changes in blood constituents can forecast the onset of clinical symptoms and therefore, blood samples will be taken from mice 1-2 times a month.

Mice are anesthetized during intrafemoral injections by isoflurane inhalation to prevent discomfort.

---

**J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Primary criterium is the development of signs of leukemia defined by weight loss, respiratory problems, behavioral changes, changes in posture or fur or a bloated belly.

For the mice that do not show any signs of leukemia at the end of the monitoring period of 52 weeks, all mice of the experimental group will be sacrificed.

Next to this, diseases which are not related to the experimental procedure (Infection, disease to to inbreed) are considered and are defined as human endpoints. In general, as soon as mice are observed to show signs of discomfort which are considered to reach general humane endpoints, mice will be sacrificed.

In general, all mice will be euthanized at signs of disease or discomfort (humane endpoint) or reaching scientific endpoint for healthy mice.

---

Indicate the likely incidence.

---

As mentioned before, mice with introduced genetic combinations have a higher chance of developing disease, especially when compound phenotypes are created, increasing the incidence and speed of onset of leukemia.

On average we expect that about 20% of the animals may succumb to leukemia in the genetic mouse models.

---

**K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The development of leukemia will lead to moderate discomfort. The frequency of leukemia development is different between genotypes as certain combinations of genetic alterations will lead to accelerated leukemia onset (For example, our lab observed Btg1-/-;lkzf1+/- mice to have an earlier leukemia onset than a wild-type control group). On average, we expect approximately 20% of the animals to develop a leukemia during the experiments.

For the genetic modelling,

Group 1.1: No irradiation, 20% of 1000 animals will develop leukemia = 200

Group 1.2: Irradiation = 1920

Group 2: No irradiation, 20% of 1000 animals will develop leukemia = 200

Total amount of animals that will experience moderate discomfort: 2320/4000 = 58% (42% mild discomfort)

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Lymphocytes derived from bone marrow and other lymphoid organs need to be isolated, and therefore, euthanization is inevitable.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

---

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

---

Yes

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0050
2. Titel van het project: Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9.00 tot 15.00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 27-03-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 13-04-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 18-05-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 18-05-2015
  - advies aan CCD: 15-06-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 20-04-2015
  - Strekking van de vragen: De niet-technische samenvatting is te lang en bevat nog veel ingewikkelde termen. De onderzoekers worden verzocht de niet-technische samenvatting aan te passen conform de richtlijnen van de CCD. De onderbouwing van de aantallen dieren die de onderzoekers willen gebruiken ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te lichten met behulp van het voorgestelde experimentele design. Uit de gegeven toelichting op de 3V's blijkt dat een aantal dieren zal worden bestraald, maar dit ontbreekt in de beschrijving van de voorgestelde dierproef. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen. Voorts worden de onderzoekers verzocht te verduidelijken op grond van welke toename van ongerief de dieren uit de proef genomen zullen worden, en met welke frequentie de dieren gecheckt zullen worden op toename van



ongerief. Andere vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen of onduidelijkheden in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 18-05-2015
  - Strekking van de antwoorden: De niet-technische samenvatting is nu aangepast. De aantallen dieren zijn nu beter onderbouwd, en de bestraling is toegevoegd aan de beschrijving van de dierproef. De onderzoekers hebben duidelijker omschreven hoe vaak zij de dieren zullen checken en bij welke toename van ongerief de dieren zullen worden gedood.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to obtain a detailed understanding of the genetic interactions between tumor suppressor genes and oncogenes and the molecular mechanisms by which our genes of interest contribute to the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as the outgrowth of drug-resistant clones in ALL'. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. De te behalen onderzoeksresultaten zullen meer inzicht verschaffen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van de expressie van tumor suppressor genen en oncogenen op de groei van leukemische cellen en op resistentie voor chemotherapie.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden

of behandeling van de dieren.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen en omstandigheden: transport van de dieren van de foklocatie naar het dierenlaboratorium, injecties intraveneus of intrafemoraal (onder verdoving) met humane tumorcellen; bestraling met een letale dosis straling waarna de dieren een transplantatie met humane hematopoietische stamcellen of leukemische cellen ontvangen, ontwikkeling van leukemie, en chemotherapie. De cumulatieve aantasting van het welzijn wordt geclassificeerd als matig voor de dieren die bestraald worden (45% van de dieren), chemotherapie ondergaan (5% van de dieren) of leukemie ontwikkelen (30% van de dieren) en licht voor de overige dieren (40% van de dieren).
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De leukemische cellen groeien niet of nauwelijks in weefselkweek, waardoor er muizen nodig zijn om voldoende tumorcellen te genereren voor het beschreven onderzoek.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 5000 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren worden twee à drie maal per week gechecked op ziekteverschijnselen, en hun bloed wordt 1 à 2 maal per maand gecontroleerd op leukemische cellen. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van leukemie op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.  
Negatieve effecten op het milieu worden voorkomen door adequate huisvesting van de dieren en voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van onderzoeksmateriaal.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 40% van de dieren is licht, en voor 60% van de dieren matig.

Tegenover de nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden. De DEC acht het belang van

die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde kennisvermeerdering en mogelijke gezondheidswinst zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus Postbus 9101  
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015146

**Bijlagen**

2

Datum 17-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015146. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 41055629  
BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: Postbus 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

**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: 15 juli 2015  
Geplande einddatum: 15 juli 2020  
Titel project: Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

15 juni 2015





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus Postbus 9101  
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015146

**Bijlagen**

2

Datum 17-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 juni 2015

Vervaldatum: 17 juli 2015

Factuurnummer: 201570146

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015146	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015146

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 15 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients met aanvraagnummer AVD103002015146. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 10 augustus 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Geert Groteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

**Radboud universitair medisch centrum**

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Geert Groteplein 10

www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Datum  
15 juni 2015

Onderwerp  
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar [redacted] als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres gebruiken [redacted]

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u tevens **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

**Factuuradres:** Radboudumc  
[redacted]  
Postbus 9101  
6500HB, Nijmegen

**Kostenplaats en kostensoort:** [redacted]  
**CDL projectnummer:** [redacted]  
**Verantwoordelijk onderzoeker:** [redacted]

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

[redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10  
6500 BH Nijmegen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
103002015146

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 25-06-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 17-06-2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie met aanvraagnummer 103002015146. Uw aanvraag is helaas niet compleet. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Aanvraagformulier niet volledig**

Het aanvraagformulier is niet volledig ingevuld. Hierbij ontvangt u een kopie van het aanvraagformulier retour waarop u het gevraagde kan aanvullen.

U heeft voor de bijlage dierproeven bij onderdeel H. de laatste vraag niet beantwoord:

'Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.'

Dit dient voor beide experimenten en voor alle soorten situaties waar het aan de orde is duidelijk te zijn.

Graag ontvangen wij het volledig ingevulde formulier van u terug.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, kunnen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

**Wanneer een beslissing**

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

**Datum**

25-06-2015

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD103002015146**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlage:**

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager		
Postcode		Huisnummer

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*

Aanvraagnummer	
----------------	--

### 2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*

<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	

### 3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
<aantal>

Datum 29-06-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 15 juni 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer 103002015146. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wij hebben hierover maandag 29 juni telefonisch contact gehad met de DEC en met u waardoor een aantal vragen zijn opgelost. De nog openstaande vragen hebben wij in deze brief opgesteld. Wij hebben afgesproken dat het streven is om de aanvraag nog met de eerstvolgende CCD-vergadering mee te laten gaan. Daarvoor moeten wij donderdagochtend de antwoorden kunnen verwerken. U kunt de antwoorden op de vragen in een apart op te tellen document toesturen, het verwerken in de projectaanvraag is niet nodig.

**Welke informatie nog nodig**

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

Het onderzoek is onderverdeeld in een aantal te nemen stappen.

*1: Gebruik geslachten:* Gebruikt u dieren van beide geslachten of gaat u selectief om met het gebruik van manlijke en vrouwelijke dieren? Zo ja, met welke onderbouwing?

*2: Ter attendering, toestemming databank:* U bent van plan een weefselbank aan te spreken met kankercellen van kinderen die terugval hebben gehad en de humane cellen in levende muizen te laten groeien en vermeerderen. Voor experimenten met humaan materiaal moet de donor toestemming geven. Onderzoek zoals dit, waarbij van xenotransplantatie sprake is gaat veel verder dan regulier onderzoek. Daarnaast is het een gevoelig onderwerp omdat het gaat om kanker kinderen. Voor dergelijk onderzoek is het mogelijk dat voor het kunnen uitvoeren van de experimenten extra procedures op gebied van medisch

ethische toetsing van de humane kant, en om te waarborgen dat er sprake is van informed consent. Heeft u zich voldoende verdiept in de bovengenoemde implicaties voor het gebruik van humaan materiaal?

**Datum**  
29-06-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

*3: Opbouw van het onderzoek:* U heeft twee experimenten als bijlage toegevoegd. Voor ieder experiment geldt dat u het heeft opgesplitst in een aantal onderdelen waarvan de samenhang niet helemaal duidelijk is. Kunt u de onderzoeksstrategie per proef verhelderen die aangeeft wat de samenhang tussen de proefonderdelen is en wat beslismomenten zijn in de studie?

*4: Aantal dieren voor experiment 1:* De gegeven berekening komt neer op  $450 + 400 + 30 + 20 = 900$  dieren. U geeft aan dat u in totaal 1000 dieren nodig heeft. Daarnaast staat bij het ongerief ook een ander aantal. Daar staat dat voor onderdeel 1.3 50% van de dieren matig ongerief heeft, wat volgens u neerkomt op 50 dieren. Dat betekent dat er in dat deel van de proef niet 50 maar 100 dieren gebruikt worden met een totaal van 950 dieren. Controleer de berekeningen en de schattingen voor beide onderdelen van de aanvraag. Pas zo nodig een en ander aan en beargumenteer hoe u komt op de gegeven groeps groottes.

*5: Aantal dieren bij experiment 2:* Het is niet duidelijk welke aantallen dieren nu gebruikt worden voor onderdelen 1.1 tm 1.3. Dit is van belang omdat de behandeling die u de dieren geeft behoorlijk verschilt. U geeft aan dat daarnaast veel dieren apart nodig zijn voor het verkrijgen van de juiste GGO dieren. Dit is niet eerder in de tekst beschreven. Specificeer daarbij het aantal dieren per behandeling. Voor 1.2 bijvoorbeeld maakt u gebruik van twee groepen dieren met andere behandelingen. Geef ook de onderbouwing voor de groeps groottes.

*6:* Voor onderdeel ex vivo karakterisering van muizen geeft u eerst aan dat er 1920 dieren nodig zijn en in de zin erna 2000. Waar komt het verschil van 80 dieren vandaan? Indien het aantal van 1920 niet klopt, geef dan ook een correcte nieuwe onderbouwing.

*7:* U schrijft bij de onderbouwing van de aantallen ex. Vivo 80 dieren per genotype. U geeft daarbij aan dat u daarvan weer verschillende screenings en onderzoeken wilt doen. U geeft daarbij een aantal voorbeelden die eerder niet genoemd zijn in het onderzoek. Geef een nadere onderbouwing van de noodzaak van het gebruiken groeps grootte en een onderbouwing hoe u aan het totaal aantal benodigde dieren komt.

*8: Gebruik GGO dieren:* U heeft telefonisch reeds aangegeven dat het creëren van GGO lijnen niet onder de vergunning valt. Onduidelijk is nog hoeveel en welke GGO lijnen u aankoopt, en welke u zelf kweekt tbv het project. Valt het aanhouden van de foklijnen buiten het project om ook onder de aangevraagde vergunning?

Indien er foklijnen zijn waarvan niet is vastgesteld dat er geen ongerief is, dan moet dit toegevoegd worden als apart projectonderdeel of als apart project voor het aanhouden van GGO dieren.



**Datum**  
29-06-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Officieel heeft u de tijd om de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief terug te sturen. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Zoals besproken delen wij u het volgende nog mede: Als wij de ontbrekende informatie donderdagochtend aanstaande (2 juli) nog kunnen verwerken, kunnen wij uw aanvraag in de eerstvolgende CCD-vergadering tot besluitvorming laten komen. Anders wordt uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering in augustus behandeld.

### **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.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 1 juli 2015 15:46  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** FW: openstaande vragen projectaanvraag dierproeven  
**Bijlagen:** ANSWERS CCD (2).docx

**Categorieën:** Dossierhouder: [REDACTED]

Omdat onze server soms niet om kan gaan met mail-to accounts stuur ik u nog een keer de file.

Met groet

[REDACTED]

[REDACTED]  
P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

[REDACTED]  
[www.radboudumc.nl](http://www.radboudumc.nl)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 1 juli 2015 15:43  
**Aan:** 'ZBO-CCD'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: openstaande vragen projectaanvraag dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

In het begeleidende word document vindt u ons antwoord op de door u gestelde vragen. Ik hoop dat we hiermee u vragen volledig en naar tevredenheid hebben kunnen beantwoorden. Mocht u morgen nog vragen hebben kunt u mij altijd bellen op onderstaand (mobiele) nummer.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

**Verzonden:** dinsdag 30 juni 2015 9:33

**Aan:** [REDACTED]

**Onderwerp:** openstaande vragen projectaanvraag dierproeven

Geachte mijnheer van [REDACTED]

Zoals telefonisch besproken stuur ik u hierbij de nog openstaande vragen in de bijgesloten brief.

Ik heb donderdagochtend tijd gereserveerd zodat we de aanvraag volgende week in de CCD vergadering kunnen behandelen.

Mocht dat onverhoopt niet lukken, dan is de eerstvolgende mogelijkheid om de aanvraag te behandelen op 07 augustus.

Als u nog vragen heeft kunt u deze aan mij stellen per mail naar dit emailadres of ons algemene telefoonnummer (zie website). Ik ben persoonlijk te bereiken op onderstaande telefoonnummer.

Ter volledigheid moet ik mededelen dat de antwoorden op de vorige brief noodzakelijk zijn omdat de aanvraag niet compleet is als deze niet volledig is ingevuld. Als de aanvraag niet compleet is, kan er besluitvorming plaatsvinden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: [REDACTED]

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.

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

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 10:39  
**Aan:** ZBO-CCD  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Vraag over aantallen bij uw aanvraag voor AVD2015146

Geachte [REDACTED]

U heeft terecht geconstateerd dat er een foutje zit in de berekeningen van het aantal muizen per graft. Dat zouden er, volgens het beschreven protocol 12 zijn i.p.v. 9.

Omdat we (deze week) de eerste resultaten hebben van onze xenograft pilots waarin we voor de twee eerste leukemieën een succesvolle engraftment zien in alle zes (2x3) muizen, denk ik dat het verantwoord is om het aantal secondary recipients (hertransplantatie) terug te brengen tot 2 muizen. De berekening wordt dan  $3 + (3 \times 2) = 9$  muizen per leukemie. De totale aantallen kunnen op deze manier ongewijzigd blijven.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]  
P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

[REDACTED]  
[www.radboudumc.nl](http://www.radboudumc.nl)

---

**Van:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 10:03  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Vraag over aantallen bij uw aanvraag voor AVD2015146

Geachte mijnheer [REDACTED]

Het advies is klaar en wordt op dit moment door het kwaliteitssysteem gevoerd ter finalisering. Daaruit is nog een vraag in de collegiale toets naar voren gekomen. Ik kon u telefonisch niet bereiken dus ik doe het per mail.

Het gaat om de aantallen dieren in proef 1.

Er staat dat er als basis drie dieren genomen worden om weefsel te vermeerderen en dat weefsel wordt verder gebruikt in drie nieuwe dieren.

Mijn collega interpreteerde dat het dan gaat om groepen van 6 dieren, of als het weefsel per muis in drie nieuwe dieren wordt gebruikt om 12 ( $3 + 9 = 12$ ) dieren.

U geeft aan dat u uitgaat van 9x 50 dieren. Kunt u daar de correcte uitleg bij geven?

Ik hoop dat het nog lukt om deze vraag vandaag nog beantwoord te krijgen. Vanmiddag worden de stukken verzonden naar de CCD.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: [Redacted]  
[Redacted]

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.

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

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 12:04  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: DEC advies bij aanvraag 2015146 leukemie

**Categorieën:** Dossierhouder: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Er zijn geen DEC-leden betrokken bij dit project, dus alle DEC-leden zijn betrokken bij de advisering.

Door de formulering in het format DEC-advies was ik in de veronderstelling dat punt B.4. alleen toegevoegd moest worden indien er betrokkenheid van DEC-leden was, en weggelaten moest worden wanneer er geen betrokkenheid was.

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 11:57  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** DEC advies bij aanvraag 2015146 leukemie

Beste [REDACTED]

We zagen dat in het DEC advies niet was ingevuld of er DEC leden mogelijk betrokken waren (punt 4). Kan dit nog worden verhelderd?

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: [REDACTED]

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.

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





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

**Uw referentie**

Datum 21-07-2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer,

Op 15-06-2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer 103002015146. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 01-07-2015 en 03-07-2015 heeft u uw aanvraag, naar aanleiding van vragen door het Secretariaat gewijzigd.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 15-07-2020.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd d.d. 15-06-2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie, maar wijken op twee punten af. Ten eerste dient beter omschreven te worden wat het stappenplan is zodat de samenhang van de verschillende projectonderdelen blijkt en de go-nogo momenten duidelijk worden. Dit moet met de IVD afgestemd worden die ook toeziet op de naleving. Ten tweede is het gebruik of fok van GGO dieren in de aanvraag onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar. De vergunning op het punt van gebruik van GGO-dieren wordt daarom beperkt tot het fokken of houden van reeds bestaande lijnen zonder ongerief óf foklijnen die onder een andere vergunning zijn gebracht als niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief (volgens de criteria die daarvoor gelden). Fokken of houden van GGO-dieren waarvan niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief, valt dus niet onder deze vergunning.

Verder nemen wij het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

**Bijlagen**

1

**Datum**  
21-07-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

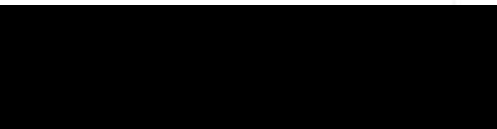
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Geert Groteplein 10  
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 15-07-2020, voor het project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer AVD103002015146, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies om twee redenen: Het stappenplan en de go-nogo momenten in het project behoeven nog verduidelijking, en het gebruik van GGO dieren in het project is onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15-06-2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15-06-2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15-06-2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 15-06-2015
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 01-07-2015 en 03-07-2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Proef 1:	Muis	950	Matig	Ja zie voorwaarden 1 en 2
Proef 2:	Muis	3920	matig	Ja zie voorwaarden 1 en 2

### Voorwaarden

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

1. Er dient beter omschreven te worden wat het stappenplan is zodat de samenhang van de verschillende projectonderdelen blijkt en de go-nogo momenten duidelijk worden. Dit moet met de IVD afgestemd worden die ook toeziet op de naleving.
2. Het gebruik of fok van GGO dieren is in de aanvraag onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar. De vergunning op het punt van gebruik van GGO-dieren wordt daarom beperkt tot het fokken of houden van reeds bestaande lijnen zonder ongerief óf foklijnen die onder een andere vergunning zijn gebracht als niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief (volgens de criteria die daarvoor gelden). Het fokken of houden van GGO-dieren waarvan niet vast staat dat er geen sprake is ongerief, valt dus niet onder deze vergunning.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder

**Datum**  
21-07-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

In alle dierproeven worden in principe zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. Hiervan kan alleen gemotiveerd worden afgeweken met toestemming van de CCD. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden, rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **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 blijven schade

**Datum**  
21-07-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015146

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS 2015168</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x	x	x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x	x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x	x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x	x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x	x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x	x	x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek DEC-advies				x		x	x	
11	Mail DEC-advies 3-7-2015				x		x	x	
12	DEC-advies				x		x	x	
13	Acceptatiebrief				x		x	x	
14	Mail aanvullende informatie 20-7-2015				x		x	x	
15	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
16	Mail aanvullende informatie II 22-7-2015				x		x	x	
17	Mail leges 13-8-2015				x		x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Mail aanpassing NTS 2-9-2015				x		x	x	
20	Beschikking				x		x	x	
21	Vergunning				x		x	x	
22	Mail beschikking 2-9-2015				x		x	x	
23	Mail terugkoppeling beschikking 9-9-2015				x		x	x	



08 JULI 2015

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted]  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

---

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

Naam instelling of organisatie [redacted]  
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted]  
 KvK-nummer [redacted]  
 Straat en huisnummer [redacted] [redacted]  
 Postbus [redacted]  
 Postcode en plaats [redacted] [redacted]  
 IBAN [redacted]  
 Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]

---

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [redacted]  
 Afdeling [redacted]  
 Telefoonnummer [redacted]  
 E-mailadres [redacted]

---

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

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [redacted]  
 Afdeling [redacted]  
 Telefoonnummer [redacted]  
 E-mailadres [redacted]



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 6 - 2015  |
| Einddatum  | 31 - 6 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |            |
|-------------|------------|
| Naam DEC    | [REDACTED] |
| Postadres   | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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


## 6 Ondertekening

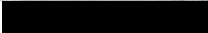
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:


Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

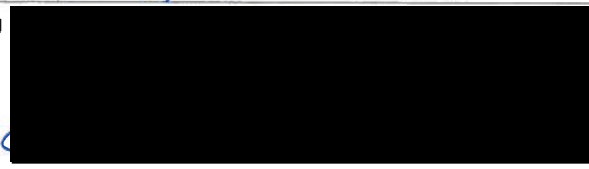
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats 

Datum 06-07-2015

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

#### Inleiding

Diabetes Mellitus, ook wel suikerziekte genoemd, is een aandoening waarbij de eilandjes van Langerhans in de alvleesklier te weinig of geen insuline produceren. Normaal gesproken reguleert insuline de hoeveelheid glucose in het bloed, maar bij diabetes is dit verstoord. Er zijn twee typen suikerziekte, Diabetes Mellitus type I en type II. Bij type II wordt er nog wel insuline geproduceerd, maar is de patiënt ongevoelig voor insuline. Deze patiënten kunnen vaak geholpen worden met medicijnen die de gevoeligheid voor insuline verhogen. Bij type I diabetes ligt dit anders. Bij deze vorm heeft het eigen lichaam de eilandjes van Langerhans middels een zogenaamd auto-immuun proces vernietigd. Dit treedt vaak al op bij kinderen en heeft als consequentie dat de jonge patiënten voor de rest van hun leven insuline moeten spuiten om hun glucose te kunnen reguleren. Dit is echter niet zonder consequenties. Insuline injecties kunnen de glucosespiegel namelijk niet zo goed reguleren als de eigen eilandjes in de alvleesklier, die normaal van minuut-tot-minuut bepalen hoeveel insuline er nodig is. Hierdoor kan zogenaamde hypoglykemie (te lage bloed glucose) ontstaan die tot coma kan leiden. Ook kan een hyperglykemie (te hoge bloed glucose) ontstaan, waardoor de bloedvaten beschadigd kunnen raken. Op lange termijn kunnen daardoor nieren uitvallen, hart- en vaatziekten optreden en aandoeningen aan zenuwbanen en ogen ontstaan.

#### Betere behandeling van Diabetes Mellitus

De beste wijze om de glucose schommelingen in de bloedbaan van type I diabetes te voorkomen is door transplantatie van de eilandjes van Langerhans. Dit kan door de hele alvleesklier te transplanteren of alleen de eilandjes. Transplantatie van de hele alvleesklier is een hele zware chirurgische ingreep en niet zonder gevaar. Naast insuline produceert de alvleesklier namelijk spijsverteringssappen. Bij transplantatie willen de spijsverteringssappen nog wel eens gaan lekken, hetgeen ernstige gevolgen kan hebben voor andere organen. Bij transplantatie van alleen de eilandjes kan dit niet gebeuren. Met het deel van de alvleesklier waarin spijsverteringssappen geproduceerd worden is ook niks mis bij type I diabetes patiënten, dus het is ook overbodig om te transplanteren. Transplantatie van eilandjes van Langerhans moet echter gepaard gaan met levenslange inname van immunosuppressieve medicijnen, die de nodige bijwerkingen hebben. Het middel is dan erger dan de kwaal. Toch wordt op beperkte schaal transplantatie van eilandjes van Langerhans reeds toegepast. Dit gebeurt meestal in patiënten die ten gevolge van een diabetische nefropathie een nier hebben verloren en een levensreddende transplantatie van een nier nodig hebben. Deze patiënten moeten om afstoting van de nier te voorkomen levenslange immunosuppressie nemen. Naast deze nier worden dan eilandjes getransplanteerd.

#### Aanleiding voor het onderzoek

In de toekomst wil men alle diabetes gaan transplanteren om schommelingen in de bloedsuikerspiegels te voorkomen. Dit zal echter zonder immunosuppressie moeten omdat immunosuppressie samenhangt met ernstige bijverschijnselen zoals infecties met bacteriën en schimmels en de ontwikkeling van tumoren. Transplantatie in combinatie met immunosuppressie zal daarom nooit een geschikt alternatief zijn voor insuline therapie. Om het gebruik van immunosuppressie te omzeilen zijn er een aantal technieken in ontwikkeling. Eén daarvan is immunoisotatie van eilandjes van Langerhans in immunoisolerende membranen. De gebruikte membranen zijn semipermeabel. De huidige generatie kapsels in [REDACTED] wordt gemaakt van alginaat dat de binnenlaag vormt en een omhulsel van de polymeer poly-L-lysine die de semipermeabele eigenschappen verzorgt. Semipermeabel wil zeggen dat de

membranen voedingsstoffen, glucose en insuline door laten maar niet de cellen en de grotere actieve stoffen van het immuunsysteem, zoals immunoglobulines en complement factoren, die de eilandjes zouden kunnen elimineren. Deze delen van het immuunsysteem kunnen als het ware de eilandjes niet meer bereiken. Cytokines, chemokines en groeifactoren, de boodschapper moleculen van het immuunsysteem, kunnen echter wel door het membraan diffunderen. Voordat klinische transplantatie van geencapsuleerde eilandjes een realiteit wordt moeten echter nog een aantal problemen overwonnen worden. Op dit moment is een aantal transplantatie series in zowel kleine als grote proefdieren en zelfs in mensen uitgevoerd [1, 2]. Hoewel in de meeste gevallen de bloedsuikerspiegels gecorrigeerd werden is er een gemeenschappelijk probleem geconstateerd. In alle gevallen was de duur van de functie beperkt tot enkele weken of maanden en was de glucose geïnduceerde insuline respons na een aantal weken reeds verstoord [1]. Door eigen onderzoek bleek dat door cytokines, chemokines en groeifactoren, geproduceerd door de host en de eilandjes, in de eerste weken na transplantatie een belangrijk deel van de eilandjes reeds verloren gaat. Dit verlies kan oplopen tot 60% van het transplantaat in de eerste twee weken. Er zijn al vooronderzoeken geweest naar de oorzaken van dit verlies. Er blijken verbeteringen nodig te zijn zowel in het intracapsulaire als in het extracapsulaire milieu.

[REDACTED]

[REDACTED]

**In dit project zullen we een aantal factoren onderzoeken die het succes en falen van geencapsuleerde eilandjes mogelijk bepalen. Daarnaast zullen we onderzoeken of het mogelijk is bronnen van andere origine te gebruiken voor transplantatie ter vervanging van humane eilandjes.**

[REDACTED]

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Gebaseerd op de wetenschappelijke overwegingen en maatschappelijke behoefte stellen wij ons tot doel mechanismen te identificeren die bijdragen aan het succes en falen van geencapsuleerde insuline-producerende eilandjes en daarop de technieken aan te passen.

[Redacted text block]

Doordat wij verschillende strategieën hebben en reeds duidelijk een fasering en go/no go besluit hebben ingebouwd verwachten wij dat het project haalbaar is. Een aantal extracellulaire matrix moleculen alsmede een aantal polymeren zullen afvallen. Dit zal echter de haalbaarheid van het project als geheel niet beïnvloeden.

### 3.3 Belang

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

#### Wetenschappelijk belang

Ad1,2. Ondanks zeer intensief onderzoek en de ontwikkeling van nieuwe en betere biomaterialen is de overleving van geencapsuleerde eilandjes in vivo nog steeds beperkt tot enkele maanden.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

**Maatschappelijk belang**

Sinds de ontdekking van insuline in 1923 is er geen noemenswaardige verandering in de behandeling van Diabetes geweest. Nog steeds worden patiënten behandeld met insuline injecties. Deze insuline injecties kunnen niet voorkomen dat de glucose spiegels schommelen. Deze schommelingen kunnen leiden tot complicaties. Daarnaast heeft het hebben van diabetes en de noodzaak tot een aangepast leven een enorme impact op de kwaliteit van leven van patiënten. Ook drukt de behandeling van Diabetes zeer zwaar op de kosten van de gezondheidszorg. Ons inziens dient onderzoek naar mogelijke genezing van Diabetes daarom een groot maatschappelijk belang. In ons onderzoek werken we aan de ontwikkeling van een therapie die zorgt voor een normale minuut-tot-minuut regulatie van de glucosespiegel en genezing. Het is aangetoond dat wanneer we dit doen ook de bovengenoemde complicaties kunnen herstellen. In eerste instantie zal de therapie gericht zijn op type I diabetes patiënten die door een autoimmuunziekte alle eilandjes van Langerhans hebben verloren. Dit is een groeiende groep van jonge patiënten (vaak kinderen) die hun hele leven insuline moeten injecteren.



### 3.4 Onderzoeksstrategie

---

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

---

Met het oog op vermindering van het aantal dieren heeft de focus in de afgelopen periode gelegen op in vitro studies in humane en dierlijke cellijnen of in dierlijk materiaal verkregen als slachtafval. We zijn dit stadium voorbij en nu zijn we toe aan een serie gedegen en goed ontworpen in vivo proeven. De strategie zal aan de hand van de bij 3.2 beschreven doelen beschreven worden met in acht neming van het reeds uitgevoerde in vitro onderzoek.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Al het voorgaande onderzoek zal plaatsvinden met allogene eilandjes van Langerhans. Dit is de setting waarin thans ook van mens tot mens wordt getransplanteerd. Echter op lange termijn, wanneer de therapie op een groot aantal patiënten zal worden toegepast, zal het tekort aan donorpancreata de



[Redacted text block]

---

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

---

[Redacted text block]

[Redacted text block]

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

Volgnummer	Type dierproef
1	[Redacted]
2	[Redacted]
3	[Redacted]
4	Kunnen stamcellen in kapsels verder rijpen om insuline producerende cellen te worden en kunnen ze daarna de diabetische staat in vivo positief beïnvloeden.
5	Kunnen foetale eilandjes afkomstig van slachtvarkens in kapsels rijpen tot functionele eilandjes van Langerhans en kunnen ze daarna de diabetische staat positief beïnvloeden.
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.


Volgnummer	Type dierproef
1	

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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



---


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.

#### **Eilandjes isolatie.**

Eilandjes zullen geïsoleerd worden uit de alveesklier van muizen. De muizen zullen onder narcose worden gebracht waarna laparotomie wordt toegepast. Na distensie van de alveesklier met collagenase oplossing wordt het dier geofferd middels cervicale dislocatie. De eilandjes worden gekweekt waarna ze behandeld worden met één van de twaalf combinaties van ECM componenten en worden geencapsuleerd. De eilandjes zijn bioluminescent en kunnen middels IVIS in vivo gevolgd worden.

#### **Transplantatie van eilandjes.**

Muizen ontvangen intraperitoneaal een injectie met streptozotocine. De eerste week wordt op drie tijdstippen een bloedmonster genomen uit de staart om de glucosespiegel te bepalen. Als de dieren twee maal achter elkaar een bloedsuikerspiegel hebben boven 20 mM glucose worden de dieren getransplanteerd. Mocht de muis niet diabetes worden dan herhalen we de behandeling met streptozotocine binnen de eerste week. Per muis zullen we circa 800-1000 eilandjes transplanteren omdat dit de dosis is die in onze handen normoglycemie induceert. We zullen of op de rug of in de buikholte transplanteren. In de muis kunnen we 4 verschillende groepen van circa 200 eilandjes kwijt en nog goed vervolgen met IVIS.



Dieren zullen onder anesthesie geofferd worden middels cervicale dislocatie.

---

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

Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groeps grootte (middels een powercalculatie) worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet en wel of niet normale verdeling van de data, om deze groeps grootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de proefopzet en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

## B. De dieren

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

Voor de studies zullen muizen van 4-8 weken worden gebruikt. Donoren mogen outbred zijn. Ontvangers zijn inbred. Herkomst van de muizen is aankoop bij waarschijnlijk [REDACTED] en/of [REDACTED] en wellicht eigen fok na aankoop (code 2. Een geregistreerd fok- of afleverbedrijf in de eu, inclusief Nederland, geen apen, of code 5. Elders ter wereld geboren, geen apen).

We kunnen 100 eilandjes gemiddeld isoleren uit een pancreas. Om 1 muis te genezen hebben daarom 8 donoren nodig. Om twaalf [REDACTED] te testen zijn 3 muizen nodig. Dus voor  $n = 1$  zijn 24 donoren nodig. Om statistisch significantie te halen moeten we de proef per [REDACTED] 8 maal herhalen. Er zijn vier test momenten. Dit maakt dat wij verwachten de komende jaren maximaal 768 donoren nodig te hebben. Echter we zullen zodra combinaties die in vitro wel maar in vivo niet succesvol zijn elimineren waardoor we verwachten minder dieren nodig te hebben.

Naakte immunoincompetente muizen van 4-8 weken oud zullen dienen als ontvanger muizen van de eilandjes. Voor de boven omschreven experimenten zijn  $8 \times 3$  (voor  $3 \times 4$  [REDACTED])  $\times 4$  (offer momenten) = 96 muizen nodig.

Dus totaal zijn er maximaal 768 donoren en 96 ontvanger muizen = 864 muizen nodig.

Totaal zijn er maximaal 864 muizen nodig maar zoals hieronder beschreven is dit een absoluut maximum.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Voor indienen maar ook tijdens uitvoer van het project wordt overwogen of het experiment noodzakelijk is. Er is een reeks in vitro experimenten vooraf gegaan waar veelbelovende componenten zijn geselecteerd. Ook tijdens de proef zullen we na elk experiment evalueren en indien nodig de proef bijstellen om gebruik van dieren te reduceren. Het bovengenoemde aantal is een absolute bovengrens. [REDACTED]

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere groepen eilandjes met verschillende behandelingen (totaal 4) te analyseren in één dier. Het gebruik van bioluminescente eilandjes vermindert ook het aantal noodzakelijke offer momenten. [REDACTED]

[REDACTED]

Verfijning is bewerkstelligd door na operatie pijnstilling te geven. Verfijning zal ook tijdens de experimenten worden toegepast. Indien blijkt dat het niet nodig is om de dieren twee maal per week te onderzoeken middels IVIS zal terug gegaan worden naar eens in de week. Dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk gehuisvest worden en kooiverrijking ontvangen. Verfijning wordt ook bewerkstelligd door de diabete dieren zo kort mogelijk diabeet te houden en het vaker verschonen van de kooi (de dieren plassen meer).

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

De kans op pijn of lijden is tot een minimum beperkt. Angst bij donoren wordt zoveel mogelijk beperkt door de dieren in groepen te huisvesten en ze bij het offeren niet in de ruimte te plaatsen waar de isolaties van de afveesklier plaatsvinden. De ontvangers worden voor de challenge handtam gemaakt. Dit maakt dat de dieren minder angst ervaren tijdens de handelingen. Er worden geen nadelige milieu effecten verwacht van het gebruik van streptozotocine. De half waarde tijd is 20 minuten en het komt nauwelijks in de urine terecht. Bedding wordt voor de zekerheid wel apart afgevoerd.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

[REDACTED]

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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



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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De ontvangers worden direct na de operatie behandeld met buprenorphine (bijv Temgesic). Standaard gebeurt dit gedurende drie dagen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De ontvanger dieren zullen tgv het diabetes zijn tijdelijk een hoge bloedsuiker hebben waardoor ze veel plassen en eten. De dieren zullen wat hyperactief zijn maar geen erg leed ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tekort aan insuline.

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

Diabetisch dieren worden zo kort mogelijk diabetes gehouden en kooien worden vaker verschoond indien nodig. Insuline wordt niet gegeven omdat dit regeneratie van de eilandjes van Langerhans kan induceren.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Na streptozotocine toediening kunnen de dieren gewicht verliezen. In geval van een gewichtsafname van meer dan 15% gedurende een week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen. Bij de donoren verwachten we geen omstandigheden die een humane eindpunt indiceren.

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

Minder dan 10%

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Matig (cumulatief) voor de ontvangers. Terminaal voor de donoren.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De donoren fungeren voor het afstaan van de alveesklier. De ontvangers worden op de aangegeven tijdstippen geofferd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
2	

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In de eerste twee weken na transplantatie vinden er ontstekingsreacties plaats. Deze worden veroorzaakt door weefsel herstelreacties die omslaan in pro inflammatoire responsen onder invloed van moleculen die uit de eilandjes lekken (zogenaamde danger associated molecular patterns (DAMPS)). De eilandjes zijn in de eerste twee weken na transplantatie erg gevoelig voor pro-inflammatoire reacties. Het gevolg is dat tot 60% van de eilandjes verloren kan gaan.

De experimenten bestaan uit twee fasen. Eerst zullen we met het equivalent van een muizen alvleesklier, 800-1000 eilandjes, onderzoeken of de overleving van het transplantaat significant beter is in aan- of afwezigheid van het specifieke farmaca dat op grond van in vitro onderzoek is geselecteerd. Indien noodzakelijk (zie hieronder) zullen we in de tweede fase een zogenaamd 'minimal graft volume' model toepassen. Dit is een internationaal geaccepteerd model waarbij onderzocht wordt of bij verschillende doses eilandjes een verbetering in functie gezien wordt. Het komt voor dat de effecten van verbetering alleen bij kleinere dosis aanwezig is zoals hieronder in meer detail zal worden uitgelegd.

[REDACTED]. Indien dit het geval is zal de kennis uit bijlage 1 gebruikt worden in de experimenten beschreven in deze bijlage. In deze serie experimenten zullen we echter met immuun-competente dieren werken en niet zoals in bijlage 1 omschreven immuun incompetent dieren.

Fase één: 800-1000 bioluminescente muizen eilandjes in het meest optimale kapsel volgend uit bijlage 1 (meest optimale ECM combinatie) zullen getransplanteerd worden in de buikholte van C57BL/6. De buikholte is de conventionele transplantatieplaats. In bijlage 1 is de huid gekozen om dieren te sparen. [REDACTED]

[REDACTED]

Op circa twee weken na transplantatie zullen een aantal dieren uit iedere groep worden geofferd om te bepalen of de behandeling heeft gezorgd voor een verhoogde overleving van het aantal eilandjes. Eerst zullen de dieren naar de IVIS gebracht worden waarna ze geofferd worden. De eilandjes zullen uit de buikholte worden teruggewonnen en onderzocht zal worden of de glucose geïnduceerde insuline respons beter is, of er meer eilandjes en meer DNA in de kapsels is terug te vinden ten opzichte van de controle, en of de eilandjes histologisch in een betere conditie zijn. Dit experiment stelt ons ook in staat om de IVIS signalen te correleren met de werkelijk overleving en vitaliteit van de eilandjes. Bij gebleken effecten zullen daarna tenminste tien dieren in iedere groep getransplanteerd worden en vervolgd worden zolang ze normoglycemisch blijven. Ongeveer wekelijks zullen de dieren aan een IVIS experiment onderworpen worden om te onderzoeken hoeveel eilandjes nog in leven zijn in de buikholte. Op ongeveer 4 en 8 weken na transplantatie zullen de dieren een glucose tolerantie test ondergaan om te bepalen hoe goed de transplantaten functioneren.

Fase twee: Het komt voor dat bij een optimaal transplantaat het effect van een verbetering niet zichtbaar wordt. Wij hebben recent deze ervaring gehad. Een bepaalde behandeling gaf geen significante verbetering in overleving wanneer het equivalent van een pancreas werd gebruikt omdat alle dieren normoglycemisch werden. Echter in de kliniek kan door het donoren tekort nooit het equivalent van een pancreas getransplanteerd worden. Een effect op een kleiner volume van eilandjes kan zeer waardevol zijn. Om die reden is het zogenaamd 'minimal graft volume' model de internationale norm geworden. Dit is speciaal ontworpen voor eilandjes onderzoek om daar waar geen verschillen te zien zijn met hoge eilandjes doseringen kleinere, marginale eilandjes doses worden gebruikt die wel een sterk effect hebben. [REDACTED]

[REDACTED] Deze doses zullen getransplanteerd worden waarna gedurende circa twee weken gemeten zal worden hoeveel dieren normoglycemisch worden. De dieren die normoglycemisch worden zullen op twee momenten na langdurige functie een glucose tolerantie test ondergaan om te bepalen hoe goed de transplantaten functioneren. De dieren zullen daarnaast om de vier weken een IVIS experiment ondergaan om het aantal overlevende eilandjes te kwantificeren.

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.

#### **Eilandjes isolatie.**

Eilandjes zullen geïsoleerd worden uit de alvleesklier van muizen. De muizen zullen onder narcose worden gebracht waarna laparotomie wordt toegepast. Na distensie van de alvleesklier met collagenase oplossing wordt het dier geofferd middels cervicale dislocatie. De eilandjes worden gekweekt waarna ze behandeld worden met de ECM componenten van bijlage 1 en geencapsuleerd. De eilandjes zijn bioluminescent en kunnen middels IVIS in vivo gevolgd worden.

#### **Transplantatie van eilandjes.**

Muizen ontvangen intraperitoneaal een injectie met streptozotocine. De eerste week wordt op drie tijdstippen een bloedmonster genomen uit de staart om de glucosespiegel te bepalen. Als de dieren twee maal achter elkaar een bloedsuikerspiegel hebben boven 20 mM glucose worden de dieren getransplanteerd. Mocht de muis niet diabetes worden dan herhalen we de behandeling met streptozotocine binnen de eerste week.

. Eerst zal een IVIS experiment worden gedaan waarna we de eilandjes middels lavage uit de buikholte halen om vervolgens de volgende parameters te onderzoeken: het aantal eilandjes dat heeft overleefd, de DNA in de kapsels (een portie van 10%), de glucose geïnduceerde insuline respons, de oxygen consumption rate, de samenstelling van de verschillende celtypen van de eilandjes, , en mogelijk gen-expressie. Dieren zullen onder anesthesie geofferd worden middels cervicale dislocatie. De andere dieren die bedoeld zijn om de langdurige overleving van het transplantaat te bestuderen zullen regelmatig aan een IVIS experiment onderworpen worden om te onderzoeken hoeveel eilandjes nog in leven zijn in de buikholte. Op twee tijdstippen na transplantatie zullen de dieren een glucose tolerantie test ondergaan om te bepalen hoe goed de transplantaten functioneren. Dieren in fase 2 zullen op identieke wijze behandeld worden mocht fase 2 noodzakelijk zijn.

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

Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte (middels een powercalculatie) worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet en wel of niet normale verdeling van de data, om deze groepsgrootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de proefopzet en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

#### **B. De dieren**

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

Voor de studies zullen 4-8 weken oude muizen worden gebruikt. Deze muizen zijn goed gekarakteriseerd en vaker gebruikt voor studies in eilandjes transplantatie en vervolging van overleving van eilandjes. Donoren mogen outbred zijn. Ontvangers zijn inbred. Herkomst van de muizen is aankoop bij waarschijnlijk en/of en wellicht eigen fok na aankoop (code 2. Een geregistreerd fok- of afleverbedrijf in de eu, inclusief Nederland, geen apen, of code 5. Elders ter wereld geboren, geen apen).

Om de vier groepen in fase 1 te transplanteren die na 2 weken worden geofferd zijn  $4 \text{ (groepen)} \times 5 \text{ (op basis van huidige power calculatie)} \times 8 \text{ (donoren)} = 160$  dieren nodig. Voor de bepaling van langdurige overleving van het transplantaat zijn  $4 \text{ (groepen)} \times 10 \text{ (op basis van huidige power calculatie)} \times 8 \text{ (donoren)} = 320$  dieren nodig. Voor fase 1 zijn dus totaal de maximaal 480 donoren nodig.

Voor fase twee zijn voor de 200 eilandjes groep 4 (groepen) x 10 (op basis van huidige power calculatie) x 2 (donoren) = 80 dieren nodig, voor de 400 eilandjes groep 4 (groepen) x 10 (op basis van huidige power calculatie) x 4 (donoren) = 160 dieren nodig, de 800 eilandjes groep zal om dieren te sparen uit fase 1 gebruikt worden. Dus fase 2 heeft 200 extra dieren als donor nodig.

C57BL/6 muizen van 4-8 weken oude zullen dienen als ontvanger muizen van de eilandjes. Voor fase 1 zijn 4 (groepen) x 5 (op basis van huidige power calculatie) = 20 ontvangers nodig voor de twee weken experiment en 4 (groepen) x 10 (op basis van huidige power calculatie) = 40 ontvangers voor het transplantaat langdurige overlevings-experiment nodig. Dus 60 totaal voor fase 1. Voor fase twee zijn 4 (groepen) x 2 (200 eilandjes en 400 eilandjes groep) x 10 (op basis van huidige power calculatie) = 80 ontvangers nodig.

Dus totaal zijn er dus 60 (fase 1) + 80 (fase 2) = 140 ontvangende muizen nodig. De dieren zullen aangekocht bij [REDACTED]

Totaal dus aangevraagd: 480 donoren (fase 1) + 200 donoren (fase 2) + 60 ontvangers (fase 1) + 80 ontvangers (fase 2) = 820 muizen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X Nee, ga door met vraag D.

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

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

X Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is reeds bewerkstelligd. We hebben voorafgaande aan deze aanvraag zeer veel in vitro experimenten gedaan om bijvoorbeeld de geschikte farmaca voor onderdrukking van de ontstekingsreactie tot één te reduceren.

[REDACTED]. Daarnaast is hier in deze bijlage 2 in de design voor een duidelijke fasering gekozen waarmee we ook dieren hopen te sparen. Als uit fase 1 blijkt dat de verschillen robuust genoeg zijn om te publiceren zullen we fase 2 niet uitvoeren. Met andere woorden door eerst het hoogste eilandjes aantal te kiezen hopen we te voorkomen dat de rest van het 'minimal graft volume' experiment niet nodig is. Ook hier zullen we tijdens de proef na elk experiment evalueren en indien nodig de proef bijstellen om gebruik van dieren te reduceren. Het bovengenoemde aantal is een absolute bovengrens. Het gebruik van bioluminescente eilandjes vermindert ook het aantal noodzakelijke opoffer momenten. Powercalculaties zullen altijd een onderdeel blijven van het gehele experiment om het aantal dieren te reduceren.

Verfijning is bewerkstelligd door na operatie pijnstilling te geven. Verfijning zal ook tijdens de experimenten worden toegepast. Indien blijkt dat het niet nodig is om de dieren twee maal per week te onderzoeken middels IVIS zal terug gegaan worden naar eens in de week. Dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk

gehuisvest worden en kooiverrijking ontvangen. Verfijning wordt ook bewerkstelligd door de diabete dieren zo kort mogelijk diabeet te houden en het vaker verschonen van de kooi (de dieren plassen meer).

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

De kans op pijn of lijden is tot een minimum beperkt. Angst bij donoren wordt zoveel mogelijk beperkt door de dieren in groepen te huisvesten en ze bij het offeren niet in de ruimte te plaatsen waar de isolaties van de alveesklier plaatsvinden. De ontvangers worden voor de challenge handtam gemaakt. Dit maakt dat de dieren minder angst ervaren tijdens de handelingen. Er worden geen nadelige milieu effecten verwacht van gebruik van streptozotocine. De half waarde tijd is 20 minuten en het komt nauwelijks in de urine terecht. Bedding wordt voor de zekerheid wel apart afgevoerd.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Er zijn wel experimenten gedaan waar algehele immunosuppressie is toegepast en daarna transplantatie. [REDACTED] We hebben intensief in de literatuur gezocht via verschillende literatuur zoeksystemen. Dit is zover wij middels literatuur onderzoek konden vinden nog niet eerder gedaan. Wij staan midden in het veld en zijn niet op de hoogte van groepen die op dit moment met hetzelfde experiment bezig zijn.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De ontvangers worden direct na de operatie behandeld met Temgesic. Standaard gebeurt dit gedurende drie dagen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De ontvanger dieren zullen tgv het diabeet zijn tijdelijk een hoge bloedsuiker hebben waardoor ze veel plassen en eten. De dieren zullen wat hyperactief zijn maar geen erg leed ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tekort aan insuline.

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

Diabetisch dieren worden zo kort mogelijk diabeet gehouden en kooien worden vaker verschoond indien nodig. Insuline wordt niet gegeven omdat dit regeneratie van de eilandjes van Langerhans kan induceren.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Na streptozotocine toediening kunnen de dieren gewicht verliezen. In geval van een gewichtsafname van meer dan 15% gedurende een week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen. Bij de donoren verwachten we geen omstandigheden die een humane eindpunt indiceren.

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

Minder dan 10%

### K. Classificatie van ongerief



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

Matig (cumulatief) voor de ontvangers. Terminaal voor de donoren.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De donoren fungeren voor het afstaan van de alvleesklier. De ontvangers worden op de aangegeven tijdstippen geofferd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
3	

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Zoals reeds uiteengezet in het hoofdvorstel zal naast het interne milieu in het onderzoek ook wetenschappelijk relevant onderzoek verricht worden naar de buitenkant van de kapsels. Thans bestaat het oppervlak uit verbindingen tussen alginaat en polylysine.



---

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.

---

**Fase 1: Implantatie van lege kapsels.**

Muizen ontvangen intraperitoneaal lege kapsels. Hiertoe zal onder narcose een kleine snede in de linea alba gemaakt worden waarna de kapsels geïnfundeerd zullen worden. Na tenminste drie tijdstippen zullen dieren geofferd worden. De dieren zullen een laparotomie ondergaan waarna de buikholte wordt schoongespoeld. Kapsels zullen in de lavage gescheiden worden van de immuuncellen. De immuuncellen en milt zullen gebruikt worden voor FACS onderzoek naar immunactivatie.

**Fase 2: Eilandjes isolatie.**

Eilandjes zullen geïsoleerd worden uit de alvleesklier van muizen. De muizen zullen onder narcose worden gebracht waarna laparotomie wordt toegepast. Na distensie van de alvleesklier met collagenase oplossing wordt het dier geofferd middels cervicale dislocatie. De eilandjes worden gekweekt waarna ze behandeld worden met de ECM componenten van bijlage 1 en geencapsuleerd. De eilandjes zijn bioluminescent en kunnen middels IVIS in vivo gevolgd worden.

**Transplantatie van eilandjes.**

Diabete muizen ontvangen intraperitoneaal een injectie met streptozotocine. De eerste week wordt op tenminste drie tijdstippen een bloedmonster genomen uit de staart om de glucosespiegel te bepalen. Als de dieren twee maal achter elkaar een bloedsuikerspiegel hebben boven 20 mM glucose worden de dieren getransplanteerd. Mocht de muis niet diabeet worden dan herhalen we de behandeling met streptozotocine binnen de eerste week. Per muis zullen we 800-1000 eilandjes transplanteren omdat dit de dosis is die in onze handen altijd normoglycemie induceert. De dieren zullen regelmatig aan een IVIS experiment onderworpen worden om te onderzoeken hoeveel eilandjes nog in leven zijn in de buikholte. Op twee tijdstippen na transplantatie zullen de dieren een glucose tolerantie test ondergaan om te bepalen hoe goed de transplantaten functioneren. Na transplantaat falen zullen we de eilandjes middels lavage uit de

---

buikholte halen om vervolgens de volgende parameters te onderzoeken: het aantal eilandjes dat nog in leven is, de DNA in de kapsels, de glucose geïnduceerde insuline respons, de oxygen consumption rate, de samenstelling van de verschillende celtypen van de eilandjes, ██████████, en mogelijk gen-expressie. Dieren zullen onder anesthesie geofferd worden middels cervicale dislocatie.

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

Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte (middels een powercalculatie) worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet en wel of niet normale verdeling van de data, om deze groepsgrootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de proefopzet en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

## B. De dieren

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

Voor de studies met polymeren zullen we 4-8 weken oude muizen gebruiken. Donoren mogen outbred zijn. Ontvangers zijn inbred. Herkomst van de muizen is aankoop bij waarschijnlijk ██████████ en/of ██████████ en wellicht eigen fok na aankoop (code 2. Een geregistreerd fok- of afleverbedrijf in de eu, inclusief Nederland, geen apen, of code 5. Elders ter wereld geboren, geen apen).

We kunnen 100 eilandjes gemiddeld isoleren uit een pancreas. Om 1 muis te genezen hebben we daarom 8 donoren nodig. Om de 5 groepen + een controle te transplanteren  $6 (\text{██████████}) \times 10$  (op basis van huidige power calculatie)  $\times 8$  (donoren) = 480 donordieren nodig.

Diabetische muizen van 4-8 weken oud zullen dienen als ontvanger muizen van de eilandjes. Hiervoor zijn maximaal  $6$  (5 polymeren + controle ██████████)  $\times 10$  (op basis van huidige power calculatie) = 60 ontvangers nodig.

Dus totaal zijn er dus  $288$  (polymeren biocompatibiliteit studie) +  $480$  (eilandjes donoren) +  $60$  (ontvangers) =  $140$  ontvangende muizen nodig.

Totaal dus aangevraagd:  $480$  donoren (fase 1) +  $200$  donoren (fase 2) +  $60$  ontvangers (fase 1) +  $80$  ontvangers (fase 2) =  $828$  muizen maximaal nodig.

Totaal zijn maximaal  $828$  muizen nodig.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is reeds bewerkstelligd voordat we gaan beginnen.

Ook hier zullen we tijdens de proef na elk experiment evalueren en indien nodig de proef bijstellen om gebruik van dieren te reduceren. Het bovengenoemde aantal is een absolute bovengrens. Het gebruik van bioluminescente eilandjes vermindert ook het aantal noodzakelijke opoffer momenten in het eilandjestransplantaat overlevingsexperiment. Powercalculaties zullen altijd een onderdeel blijven van het gehele experiment om het aantal dieren te reduceren.

Verfijning is bewerkstelligd door na operatie pijnstilling te geven. Verfijning zal ook tijdens de experimenten worden toegepast. Indien blijkt dat het niet nodig is om de dieren twee maal per week te onderzoeken middels IVIS zal terug gegaan worden naar eens in de week. Dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk gehuisvest worden en kooiverrijking ontvangen. Verfijning wordt ook bewerkstelligd door de diabete dieren zo kort mogelijk diabeet te houden en het vaker verschonen van de kooi (de dieren plassen meer).

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

De kans op pijn of lijden is tot een minimum beperkt. Na transplantatie van lege kapsels zullen de dieren de eerste week dagelijks bekeken worden. Als dieren afvallen of haren recht hebben kan dit wijzen op een heftige ontstekingsreactie en zal de proef worden afgebroken.

Angst bij donoren wordt zoveel mogelijk beperkt door de dieren in groepen te huisvesten en ze bij het offeren niet in de ruimte te plaatsen waar de isolaties van de alvleesklier plaatsvinden. De ontvangers worden voor de challenge handtam gemaakt.

Dit maakt dat de dieren minder angst ervaren tijdens de handelingen. Er worden geen nadelige milieu effecten verwacht van gebruik van het gebruik van streptozotocine. De half waarde tijd is 20 minuten en het komt nauwelijks in de urine terecht. Bedding wordt voor de zekerheid wel apart afgevoerd.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

## F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

## G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De ontvangers van lege kapsels en eilandjes bevattende kapsels worden direct na de operatie behandeld met buprenorfine (Temgesic). Standaard gebeurt dit gedurende drie dagen. Ook zullen ontvangers van lege kapsels die pijn lijken te hebben onmiddellijk met buprenorfine (Temgesic) behandeld worden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De ontvanger dieren zullen tgv het diabetes zijn tijdelijk een hoge bloedsuiker hebben waardoor ze veel plassen en eten. De dieren zullen wat hyperactief zijn maar geen erg leed ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tekort aan insuline.

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

Diabetisch dieren worden zo kort mogelijk diabeet gehouden en kooien worden vaker verschoond indien nodig. Insuline wordt niet gegeven omdat dit regeneratie van de eilandjes van Langerhans kan induceren.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het komt voor dat na transplantatie van lege kapsels een hevige ontstekingsreactie plaatsvindt. In geval van een gewichtsafname van meer dan 10% gedurende de eerste week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen.

Na streptozotocine toediening kunnen de dieren gewicht verliezen. In geval van een gewichtsafname van meer dan 15% gedurende een week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen. Bij de donoren verwachten we geen omstandigheden die een humane eindpunt indiceren.

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

Minder dan 10%

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

Matig (cumulatief) voor de ontvangers. Terminaal voor de donoren.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De donoren fungeren voor het afstaan van de alvleesklier. De ontvangers worden op de aangegeven tijdstippen geofferd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	[REDACTED]	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[REDACTED]	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	4	Kunnen stamcellen in kapsels verder rijpen om insuline producerende cellen te worden en kunnen ze daarna de diabetisch staat in vivo positief beïnvloeden.

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Op termijn zal bij toename van het aantal getransplanteerde patiënten de beschikbaarheid van voldoende donoren een groot probleem worden. Om die reden wordt nu reeds onderzoek gedaan naar alternatieve bronnen voor eilandjes. [REDACTED]

[REDACTED] Deze cellen brengen bepaalde eilandjes-specifieke factoren tot expressie maar moeten in vivo verder rijpen om een volwaardige insuline producerende cel te worden. Dit gaat het beste in kapsels. Een additioneel voordeel van uitvoer in kapsels is dat de kapsels met cellen eenvoudig teruggewonnen kunnen worden.



De humane stamcellen zullen in drie verschillende doses getransplanteerd worden in naakte, immuno-incomponente naakte muizen. We kiezen na discussie met onze partners bewust voor immuno-incompetent omdat we naar rijping willen kijken en invloed van allerlei mogelijke immuunresponsen en cytokine diffusie naar de cellen willen voorkomen. De dieren zullen circa twee weken voor de implantatie diabeet gemaakt worden middels intraveneuze injectie van streptozotocine. Na diabetes inductie zullen de dieren een insuline tablet onder de huid ontvangen omdat de transplantaten van stamcellen niet onmiddellijk normoglycemie zullen herstellen (zoals verwacht in bijlage 1 en 2). Dit insuline tablet vermindert leed omdat de dieren normale glucose spiegels zullen hebben tussen de maaltijden. Na implantatie zal wekelijks bloed worden afgenomen bij de muizen voor bepaling van [REDACTED]

[REDACTED] Een groep dieren zal bij verwijdering van het tablet worden geofferd voor bestudering van de ex vivo glucose geïnduceerde insuline respons, de respons op aminozuren, de samenstelling van de verschillende eilandjes cellen (percentage beta-, alpha celen) in de gerijpte cellen. [REDACTED]

Een groep van ongeveer tien dieren zal na verwijdering van het insuline tablet gedurende een langere periode vervolgd worden om de overlevingsduur en functie te bestuderen. Wekelijks zal hiertoe bloed worden afgenomen via de staartvene om [REDACTED]

Dit is een lopend onderzoek waarbij verschillende kweek omstandigheden de komende jaren getest zullen worden. We verwachten maximaal 6 verschillende kweekomstandigheden te testen de komende jaren. Bij iedere implantatie van een formulering zal een groep worden meegenomen waarbij de drie doses ook onder het nierkapsel worden getransplanteerd. [REDACTED]

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.

### **Transplantatie van humane stamcellen.**

Muizen ontvangen intraperitoneaal een injectie met streptozotocine. De eerste week wordt op drie tijdstippen een bloedmonster genomen uit de staart om de glucose spiegel te bepalen. Mocht de muis niet diabeet worden dan herhalen we de behandeling met streptozotocine binnen de eerste week. Als de dieren twee maal achter elkaar een bloedsuikerspiegel hebben boven 20 mM glucose worden de dieren geïmplanteerd met een insuline tablet. Direct erna kunnen ook de stamcellen getransplanteerd worden. Per kweekomstandigheid zullen we drie doses stamcellen testen. De aantallen stamcellen die nodig zijn worden berekend aan de hand van de c-peptide productie door de cellen. Dit is kweekomstandigheid afhankelijk en hier kan nu nog niet op vooruit gelopen worden. De geencapsuleerde cellen worden in de buikholte getransplanteerd, de niet geencapsuleerde onder het nierkapsel. [REDACTED]

Wekelijks zal vanuit de staart [REDACTED] Zodra de c-peptide niveaus oplopen kan besloten worden de dieren dagelijks te meten. Uit literatuur gegevens blijkt dat het 6 tot 4 maanden kan duren totdat de niveau's dusdanig zijn dat het tablet verwijderd kan worden. Als na circa 6 maanden nog geen effect op c-peptide gemeten is wordt de proef beëindigd en het dier geofferd. Mochten dieren na verwijdering van het tablet normoglycemisch worden dan worden ze tenminste een jaar vervolgd. Op circa 6 weken en drie maanden na constatering van normoglycemie zal een glucose tolerantie test worden uitgevoerd. Er zijn twee offer momenten. Dit is het moment waarop de [REDACTED] een acceptabel niveau bereikt heeft om verdere studie noodzakelijk te maken en na afloop van de proef. Dieren zullen onder anesthesie geofferd worden middels cervicale dislocatie.

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

Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn op basis van literatuur gegevens berekend en zullen opnieuw berekend worden ter controle en vergelijk als we zelf de eerste drie transplantaties hebben gedaan. Op basis van deze gegevens kan een

groeps grootte [redacted] worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet en wel of niet normale verdeling van de data, om deze groeps grootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de proefopzet en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

## B. De dieren

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

Muizen van 4-8 weken oud zullen dienen als ontvanger muizen van de humane stamcellen. Herkomst van de muizen is aankoop bij waarschijnlijk Jackson en/of Harlan en wellicht eigen fok na aankoop (code 2. Een geregistreerd fok- of afleverbedrijf in de eu, inclusief Nederland, geen apen, of code 5. Elders ter wereld geboren, geen apen).

[redacted]

[redacted]

In totaal zijn er maximaal 420 ontvanger muizen nodig.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X Nee, ga door met vraag D.

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

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

X Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is gedaan door de cellen zover mogelijk middels cocktails van groeifactoren te laten differentiëren. Helaas is een in vivo rijping voor aanpassing aan het in vivo milieu een noodzaak. We combineren dit echter met een functionele, transplantaat overlevingsstudie waardoor aantallen dieren gespaard kunnen worden.

Vermindering wordt bewerkstelligd door een design waarbij rijping en overleving gecombineerd worden. We kunnen daardoor uit met lagere aantallen dieren. Het bovengenoemde aantal is een absolute bovengrens. Powercalculaties zullen altijd een onderdeel blijven van het gehele experiment om het aantal dieren te reduceren. Als we een optimaal celkweek protocol hebben voordat we 6 experimenten hebben gedaan zullen we het aantal benodigde dieren naar beneden bijstellen.

Verfijning is bewerkstelligd door na operatie pijnstilling te geven. Verfijning zal ook tijdens de experimenten worden toegepast. Indien blijkt dat het niet nodig is om de dieren twee maal [REDACTED] Dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk gehuisvest worden en kooiverrijking ontvangen. Verfijning wordt ook bewerkstelligd door de diabete dieren zo kort mogelijk diabeet te houden en het vaker verschonen van de kooi (de dieren plassen meer).

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

De kans op pijn of lijden is tot een minimum beperkt. De muizen worden handtam gemaakt zodat bloed afname geen angstige zaak wordt. Er worden geen nadelige milieu effecten verwacht van gebruik van streptozotocine. [REDACTED]. Bedding wordt voor de zekerheid wel apart afgevoerd.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Wereldwijd wordt er stamcel onderzoek gedaan met wisselend succes. Naar pluripotente stamcellen vanuit humaan beenmerg wordt minder onderzoek gedaan. Het is erg nieuw. Zover wij weten worden deze specifieke bronnen nog niet gebruikt. Wij werken samen met een autoriteit op dit gebied die unieke kennis heeft en zover wij kunnen overzien is dit experiment in de huidige setting nooit eerder gedaan. Ook is uitgebreid in de literatuur gekeken maar er is tot dus ver geen vergelijkbare benadering gevonden. Voor wat betreft de opzet met encapsulatie benaderingen zijn wij voor zover wij weten uniek.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De ontvangers worden direct na de operatie behandeld met buprenorfine (Temgesic). Standaard gebeurt dit gedurende drie dagen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De ontvanger dieren zullen tgv het diabeet zijn tijdelijk een hoge bloedsuiker hebben waardoor ze veel plassen en eten. De dieren zullen wat hyperactief zijn maar geen erg leed ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tekort aan insuline.

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

Diabetische dieren worden zo kort mogelijk diabeet gehouden en kooien worden vaker verschoond indien nodig. Insuline wordt niet gegeven omdat dit regeneratie van de eilandjes van Langerhans kan induceren.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Na streptozotocine toediening kunnen de dieren gewicht verliezen. In geval van een gewichtsafname van meer dan 15% gedurende een week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen.

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

Minder dan 10%

### K. Classificatie van ongerief

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

Matig (cumulatief) voor de ontvangers.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De donoren fungeren voor het afstaan van de alvleesklier. De ontvangers worden op de aangegeven tijdstippen geofferd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	<div style="background-color: black; width: 100px; height: 15px;"></div>	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	<div style="background-color: black; width: 150px; height: 15px;"></div>	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	5	Kunnen foetale eilandjes afkomstig van slachtvarkens in kapsels rijpen tot functionele eilandjes van Langerhans en kunnen ze daarna de diabetische staat positief beïnvloeden.

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Net als bijlage 4 heeft dit project tot doel om het donoren tekort op te vangen zodra geencapsuleerde eilandjes een klinisch toepasbare therapie wordt. De doelen en primaire uitkomstparameters zijn gelijk aan bijlage 4. Ook hier worden kweekomstandigheden gezocht om rijping en glucose responsiviteit van de foetale varkens eilandjes in vitro omhoog te brengen. Hier echter verwachten we drie formuleringen te testen daar de cellen reeds verder gedifferentieerd zijn dan de humane stamcellen. Daarnaast willen we de meest succesvolle formulering niet alleen in immunoincompetente muizen maar ook in immuun competente muizen in kapsels testen om te bepalen of de kapsels afdoende beschermen tegen xenogene reacties (bij dier naar mens). Alle huidige kapsel formuleringen zijn namelijk ontworpen en getest in allogene settings (bijv van mens naar mens).

De foetale varkensilandjes zullen in drie verschillende doses getransplanteerd worden in immuno-incompetente naakte muizen. De dieren zullen circa twee weken voor de implantatie diabeet gemaakt worden middels intraveneuze injectie van streptozotocine. De rest van de experimentele aanpak is gelijk aan die van de humane stamcellen in Bijlage 4: Na diabetes inductie zullen de dieren een insuline tablet onder de huid ontvangen. Dit insuline tablet vermindert leed. Na implantatie zal wekelijks bloed worden afgenomen bij de muizen

Als de c-peptide niveaus dusdanig zijn dat verwacht wordt dat het transplantaat de glucosespiegel kan controleren wordt het tablet verwijderd. Een groep dieren zal bij verwijdering van het tablet worden geofferd voor bestudering

Een groep van circa tien dieren zal na verwijdering van het insuline tablet gedurende een langere periode vervolgd worden om de overlevingsduur en functie te bestuderen. Wekelijks zal hiertoe bloed worden afgenomen via de staartvene om de glucose spiegel en donor-specifieke c-peptide niveaus te bestuderen.

Het betreft hier een project waarin we de komende jaren na lering te hebben getrokken uit vorige experimenten minimaal drie formuleringen van gekweekte foetale varkensilandjes verwachten te testen. Ook hier zal bij iedere implantatie van een formulering een groep worden meegenomen waarbij de drie doses ook onder het nierkapsel wordt getransplanteerd. Hoewel teratoma formatie niet verwacht wordt bij gebruik van foetale eilandjes willen we ook hier de waarde van de encapsulatie voor rijping van de cellen vaststellen en vaststellen of migratie van cellen uit de foetale eilandjes plaatsvindt.

De meest succesvolle formulering zal geselecteerd worden om de functionaliteit van de eilandjes in kapsels in immuno-competente dieren te testen. De berekende dosering volgend uit de eerste serie experimenten zal hiervoor gebruikt worden. Mocht het kapsel onvoldoende bescherming bieden dan zullen vernieuwende formuleringen van kapsels getest worden.

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.

### **Transplantatie van foetale varkensilandjes.**

Muizen ontvangen intraperitoneaal een injectie met streptozotocine. De eerste week wordt op drie tijdstippen een bloedmonster genomen uit de staart om de glucose spiegel te bepalen. Mocht de muis niet diabeet worden dan herhalen we de behandeling met streptozotocine binnen de eerste week. Als de dieren twee maal achter elkaar een bloedsuikerspiegel hebben boven 20 mM glucose worden de dieren geïmplanteerd met een insuline tablet. Direct erna kunnen ook de foetale eilandjes getransplanteerd worden. Per kweekomstandigheid zullen we drie doses foetale eilandjes testen. De geencapsuleerde eilandjes worden in de buikholte getransplanteerd, de niet geencapsuleerde onder het nierkapsel.

Wekelijks zal vanuit de staart door tailsnapping een druppel bloed worden afgenomen. Zodra de c-peptide niveaus oplopen kan besloten worden de dieren dagelijks te meten. Het is niet bekend hoe lang dit kan duren en is derhalve onderdeel van het onderzoek. Als na circa 6 maanden nog geen effect op c-peptide gemeten is wordt de proef beëindigd en het dier geofferd. Mochten dieren na verwijdering van het tablet normoglycemisch worden dan worden ze een jaar vervolgd. Er zijn twee offer momenten. Dit is het moment waarop de een acceptabel niveau bereikt heeft om verdere studie noodzakelijk te maken en na afloop van de proef. Dieren zullen onder anesthesie geofferd worden middels cervicale dislocatie.

De meest succesvolle kweekomstandigheid wordt toegepast voor een xenotransplantatie experiment in muizen. De meest optimale dosis zal volgen uit berekeningen gebaseerd op de eerste experimentenserie. Het verdere protocol van de behandeling van de dieren is gelijk aan de situatie als beschreven voor de diabete muizen. Indien vroegtijdig transplantaat falen optreedt zullen we aanpassingen aan de kapsels uitvoeren zoals verandering van de

doorlaatbaarheid (semi permeabele eigenschappen). Let op: we starten dit pas na afronding van bijlage 1 en 2 dus we gebruiken de meest optimale kapsel-formulering die wellicht aan de xeno-omstandigheden moet worden aangepast. We verwachten maximaal 3 transplantatie series nodig te hebben om tot een optimale formulering te komen.

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

Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groeps-grootte [redacted] worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet en wel of niet normale verdeling van de data, om deze groeps-grootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de proefopzet en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

### B. De dieren

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

Muizen van 4-8 weken oud zullen dienen als ontvanger muizen van de foetale varkenseilandjes. Herkomst van de muizen is aankoop bij waarschijnlijk Jackson en/of Harlan en wellicht eigen fok na aankoop (code 2. Een geregistreerd fok- of afleverbedrijf in de eu, inclusief Nederland, geen apen, of code 5. Elders ter wereld geboren, geen apen).

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

In totaal zijn er maximaal  $210 + 110 = 320$  muizen nodig.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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



#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging is gedaan door de foetale eilandjes reeds middels cocktails van groeifactoren te laten differentiëren. Ze zijn al zover dat ze insuline produceren.

Vermindering wordt bewerkstelligd door net als in bijlage 4 voor een design te kiezen waarbij rijping en overleving gecombineerd worden. Ook faseren we het onderzoek met aantallen eilandjes en we onderzoeken eerst in naakte dieren hoeveel eilandjes nodig zijn alvorens we naar immunocompetente dieren overstappen. We scheiden zo de parameters dosis en immuniteit. Door deze stapsgewijze benadering verwachten we sneller en met minder dieren tot een werkzaam varkenstransplantaat te komen. Het bovengenoemde aantal is een absolute bovengrens. Powercalculaties zullen altijd een onderdeel blijven van het gehele experiment om het aantal dieren te reduceren. De berekeningen zijn op allotransplantatie gebaseerd. Het kan voorkomen dat dit anders uit gaat pakken voor xenotransplantatie.

Verfijning is bewerkstelligd door na operatie pijnstilling te geven. Verfijning zal ook tijdens de experimenten worden toegepast. Indien blijkt dat het niet nodig is om de dieren twee maal per week te onderzoeken middels IVIS zal terug gegaan worden naar eens in de week. Dieren zullen zoveel mogelijk gezamenlijk gehuisvest worden en kooiverrijking ontvangen. Verfijning wordt ook bewerkstelligd door de diabete dieren zo kort mogelijk diabeet te houden en het vaker verschonen van de kooi (de dieren plassen meer).

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

De kans op pijn of lijden is tot een minimum beperkt. De muizen worden handtam gemaakt zodat bloed afname geen angstige zaak wordt. Er worden geen nadelige milieu effecten verwacht van gebruik van streptozotocine. De half waarde tijd is 20 minuten en het komt nauwelijks in de urine terecht. Bedding wordt voor de zekerheid wel apart afgevoerd.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

Wat betreft de opzet met encapsulatie benaderingen zijn wij voor zover wij weten uniek. We monitoren continu de literatuur middels verschillende zoeksystemen maar tot dus ver zijn er geen systemen met een vergelijkbaar succes percentage. Foetale varkens eilandjes worden geïsoleerd uit de foetale varkenspancreas met de methoden van Prof Lakey van de Universiteit van Californië. Hij is een autoriteit op dit gebied en heeft een goed overzicht over het veld. Voor zover wij kunnen overzien is niemand met deze benadering en serie experimenten op het moment aan het werk. Ook hier wordt regelmatig de literatuur voor gemonitord en we bezoeken relevante congressen.

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De ontvangers worden direct na de operatie behandeld met Temgesic. Standaard gebeurt dit gedurende drie dagen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De ontvanger dieren zullen tgv het diabetes zijn tijdelijk een hoge bloedsuiker hebben waardoor ze veel plassen en eten. De dieren zullen wat hyperactief zijn maar geen erg leed ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tekort aan insuline.

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

Diabetische dieren worden zo kort mogelijk diabetes gehouden en kooien worden vaker verschoond indien nodig. Insuline wordt niet gegeven omdat dit regeneratie van de eilandjes van Langerhans kan induceren.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Na streptozotocine toediening kunnen de dieren gewicht verliezen. In geval van een gewichtsafname van meer dan 15% gedurende een week zullen de dieren worden getermineerd om verder ongerief te voorkomen.

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

Minder dan 10%

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Matig (cumulatief) voor de ontvangers.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De donoren fungeren voor het afstaan van de alvleesklier. De ontvangers worden op de aangegeven tijdstippen geofferd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168

**Bijlagen**

2

Datum 08-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is [redacted] 2015168. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 juni 2015  
Geplande einddatum: 30 juni 2020  
Titel project: Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes  
Titel niet-technische samenvatting: Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  Alleen originele aanvraagformulier

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: [REDACTED]

Datum: 6 juli 2015





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168  
**Bijlagen**  
2

Datum 08-07-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

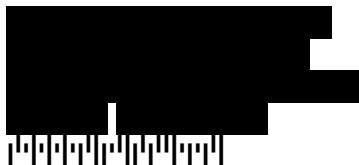
Factuurdatum: 8 juli 2015  
Vervaldatum: 7 augustus 2015  
Factuurnummer: 201570168

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag [redacted] 2015168	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168

Datum  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [redacted],  
Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes met aanvraagnummer [redacted] 2015168.

**DEC advies gevraagd**

Uw aanvraag is naar [redacted] gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.  
Uw aanvraag wordt door een andere dan de door u aangegeven DEC van een advies voorzien. andere gegevens

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 14:31  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** DEC advies nieuw project ([REDACTED])  
**Bijlagen:** [REDACTED] NTS-2.pdf; bijlage 2-onderdrukkingontsteking-dierproeven-na-IVD-en-DEC.pdf; bijlage 3-polymeren onderzoek-dierproeven-na-IVD-en-DEC.pdf; bijlage 4-humane stamcellen-dierproeven-na-ivd-DEC.pdf; bijlage 5-varkens stamcellen-dierproeven-na-ivd-na-DEC.pdf; bijlage1-\_ecmeneilandjes\_dierproeven\_1.0-na-ivd-en-DEC.pdf; DEC advies [REDACTED].pdf; projectvoorstel encapsulatie-na-ivd-en-DEC.pdf

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project ([REDACTED]). Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlage, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens [REDACTED],

[REDACTED]

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [REDACTED] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. [REDACTED] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer ( [REDACTED] )
2. Titel van het project: **Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes**
3. Titel van de NTS: **Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van diabetes**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon [REDACTED]
  - [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **11-06-2015**
  - aanvraag compleet: **11-06-2015**
  - in vergadering besproken: **18-06-2015**
  - anderszins behandeld: **29-06-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **22-06-2015 tot 26-06-2015**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: **26-06-2015**
  - advies aan CCD **03-07-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**

- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
- Datum: **22-06-2015:**
  - Strekking van de vraag / vragen: **Er zijn vragen gesteld omtrent onderbouwing te onderzoeken groepen en groeps groottes, transplantatie plaatsen en ongerief na (multiple) IVIS scans**
  - Datum antwoord: **26-06-2015**
  - Strekking van het (de) antwoord(en): **Alle bovengenoemde zaken zijn duidelijker onderbouwd en aangegeven**
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag : **Ja**
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): **n.v.t.**
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **N.v.t.**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **Ja**

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **Ja**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **N.v.t.**

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Bijlage1-10: Ja**

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen: nee**

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Per voorgestelde dierproef in de diverse bijlagen is het aantal dieren, na beantwoorden van de vragen, statistisch voldoende onderbouwd. De statistische methoden zijn, na vragen hieromtrent, duidelijker aangegeven. Het onderzoek is gefaseerd van opzet en leidt zo tot een vermindering van het aantal benodigde dieren.**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. **De aanvraag is in overeenstemming**

**met de 3V's, de humane eindpunten zijn concreet geformuleerd.** Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten **NVT**

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd **De achtergrond van deze projectbeschrijving is een heldere uiteenzetting van aanleiding, achtergrond en context van het voorgestelde onderzoek. Het medisch en maatschappelijke belang van de voorgestelde dierproeven is helder.**

## **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

**Onderzoek naar de behandeling en mogelijk genezing van diabetes is van zodanig wetenschappelijk en zeker ook maatschappelijk belang dat het gebruik van proefdieren geoorloofd is, mits aan proefdierkundige en ethische voorwaarden is voldaan. De DEC heeft er zich – na beantwoording door de onderzoekers van aanvullende vragen over onder meer inachtneming van de 3 V's – van overtuigd dat aan deze voorwaarden zal worden voldaan. Mede met het oog op een mogelijke doorbraak in de behandeling van diabetes door de voorgestelde methode, komt de DEC daarom tot een positieve ethische afweging.**

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD  
**X** De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

**Dit besluit is unaniem door de DEC genomen.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [redacted]

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes met aanvraagnummer [redacted] 2015168. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 2 september 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.





Indien u deze informatie niet bekend is, zullen we na u reactie met de aanvrager contact opnemen met dezelfde vraag.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk dinsdag, 21 juli 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk bedankt voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,

██████████

*Uitvoeringsexpert*

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

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

**T: 0900 2800028**

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

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. ██████████ kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. ██████████ cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centrale  
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 21 juli 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes" met aanvraagnummer [redacted] 2015168. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk dinsdag 28 juli 2015, indien mogelijk.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

**Meer informatie**

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

**Datum**  
21 juli 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED] 2015168

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager		
Postcode		Huisnummer

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*

Aanvraagnummer	
----------------	--

### 2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*

<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	

### 3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 22 juli 2015 12:20  
**Aan:** Info-zbo  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvullende informatie aanvraag [REDACTED] 2015168

Geachte [REDACTED]

Naar aanleiding van het telefonisch overleg tussen [REDACTED] en de ccd stuur ik u conform afspraak het antwoord op uw vraag per mail.

Hieronder volgt in **bold** uw vraag gevolgd door mijn antwoord.

**U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?**

Er zijn verschillen in efficiëntie van isolatie tussen mannelijke en vrouwelijke muizen. Er zijn door geslachtsverschillen in [REDACTED] andere enzymcombinaties nodig. Echter niet alleen verschillen in procedure zijn een probleem maar ook de uiteindelijke opbrengst. In onze handen halen wij uit mannelijke muizen meer eilandjes. Daarnaast is de cyclus bij vrouwelijke muizen problematisch. Niet alleen de efficiëntie van isolatie varieert met de cyclus maar ook diabetes inductie en zelfs de immunologische responsen tegen de kapsels zijn afhankelijk van het geslacht [1]. Om al deze variaties te voorkomen geven wij er de voorkeur aan om uitsluitend mannelijke muizen te gebruiken in deze studies .

[REDACTED]

Hopende uw vraag afdoende beantwoord te hebben verblijf ik.

[REDACTED]

[REDACTED]

The Netherlands

[REDACTED]

---

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

**Verzonden:** dinsdag 21 juli 2015 15:34

**Aan:** [REDACTED]

**Onderwerp:** Aanvullende informatie aanvraag [REDACTED] 2015168

Geachte [REDACTED]

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes" met aanvraagnummer [REDACTED] 2015168. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

De brief is ook per post naar de vergunninghouder, [REDACTED], verzonden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

*Uitvoeringsexpert*

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

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

**T: 0900 2800028**

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

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [REDACTED] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. [REDACTED] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

[Redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 13 augustus 2015 13:07  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Leges voor aanvraag [Redacted] 2015168

Geachte [Redacted]

De leges die u verschuldigd bent voor aanvraag [Redacted] 2015168 zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 13:59  
**Aan:** Info-zbo; [redacted]  
**CC:** [redacted]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [redacted] 2015168  
**Bijlagen:** [redacted] NTS-3-3.docx  
  
**Categorieën:** Dossier: [redacted]

vanzelfsprekend, ingesloten vindt u hem

[redacted]

[redacted]  
 [redacted]  
 [redacted]  
 [redacted]

The Netherlands

[redacted]  
 [redacted]  
 [redacted]  
 [redacted]

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]  
**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 13:55  
**Aan:** [redacted]  
**CC:** [redacted]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [redacted] 2015168

Zou u dan zelf dat in de NTS willen aanpassen, alstublieft?  
 Wij mogen de NTS niet tekstueel veranderen.

Wij ontvangen graag zsm de nieuwe versie.

Alvast bedankt.

Met vriendelijke groet,

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

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

T: 0900 2800028

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

---

**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 13:47  
**Aan:** Info-zbo; [redacted]

CC: [redacted]

Onderwerp: RE: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [redacted] 2015168

Mijn excuus dat is een fout van mij. Het moet 2512 zijn.

Met vriendelijke groet

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

The Netherlands

[redacted]

[redacted]

[redacted]

---

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

**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 13:16

**Aan:** [redacted]

**CC:** [redacted]

**Onderwerp:** RE: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [redacted] 2015168

Beste [redacted]

Bedankt voor uw reactie en de aangepaste versie van de NTS.

We hebben nog een onduidelijkheid: in de NTS staat onder 3.3 dat er 2302 muizen nodig zijn. Maar volgens de bijlagen beschrijving dierproeven horend bij de aanvraag komen wij voor de vergunde dierproeven op een totaal van 2512 muizen (d1: 864; d2:820; 828).

Over hoeveel dieren gaat het dus? Als de aantallen vermeld onder de dierproeven ook niet kloppen, graag ontvangen we de juiste aantallen om deze in de vergunning correct op te nemen.

Zou de aanvrager dus het aantal dieren willen aanpassen?

Als we vandaag al de correcte versie van de NTS ontvangen, kunnen we morgen de beschikking en vergunning al naar de aanvrager sturen.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 12:38  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Onderwerp:** FW: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [REDACTED] 2015168

Beste CCD,

Bijgaand stuur ik namens [REDACTED] de herziene versie van de NTS betreffende het vergunde deel van aanvraag [REDACTED] 2015168.

met vriendelijke groet,

[REDACTED]

----- Forwarded message -----

From: **Info-zbo** <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
Date: 2015-09-01 15:58 GMT+02:00  
Subject: Verzoek tot aanpassing NTS aanvraag [REDACTED] 2015168  
To: [REDACTED]  
Cc: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Op 8 juli 2015 hebben we uw aanvraag met titel “Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes” en aanvraagnummer [REDACTED] 2015168 ontvangen.

De CCD heeft uw aanvraag beoordeeld, en besloten deze gedeeltelijk goed te keuren. Daarom hebben wij een herziene versie van de Niet Technische Samenvatting van u nodig, waarin u het vergunde gedeelte van uw project beschrijft.

De commissie is van mening dat de dierproeven 4 en 5 (‘Kunnen stamcellen in kapsels verder rijpen om insuline producerende cellen te worden en kunnen ze daarna de diabetische staat in vivo positief beïnvloeden’ en ‘Kunnen foetale eilandjes afkomstig van slachtvarkens in kapsels rijpen tot functionele eilandjes van Langerhans en kunnen ze daarna de diabetische staat positief beïnvloeden’) niet samenhangen met de andere dierproeven, maar een aparte doelstelling dienen. Een aanvraag mag slechts een doelstelling dienen. De in uw aanvraag beschreven dierproeven 1 t/m 3 richten zich op het verbeteren van de extracellulaire matrix moleculen en de overleving van de geëncapsuleerde eilandjes. De dierproeven 4 en 5 beschrijven onderzoek gedaan aan stamcellen. De commissie ziet de twee onderzoekslijnen als twee aparte onderzoeksprojecten. Daarom keuren we uw dierproeven 1 t/m 3 goed, maar de dierproeven 4 en 5 moeten als een aparte aanvraag worden ingediend. U mag onder deze vergunning alleen de dierproeven 1 t/m 3 uitvoeren.

Zodra wij de nieuwe versie van de NTS hebben ontvangen sturen wij de beschikking en vergunning aan u toe. Tot die tijd kunt u niet met uw project “Verbetering van de overleving van geencapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes” beginnen.

We hopen snel van u dit document te ontvangen.

Met vriendelijke groet,

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

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

--  
[Redacted signature block]

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [Redacted] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. [Redacted] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [Redacted] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. [Redacted] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. [Redacted] kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this

message in any way. [REDACTED] cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

### Onze referentie

Aanvraagnummer  
[redacted] 2015168

### Bijlagen

1

Datum 2 september 2015  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes' met aanvraagnummer [redacted] 2015168 en bestaande uit 5 dierproeven. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes' starten, maar alleen met de dierproeven 1 t/m 3. De vergunning wordt afgegeven van 2 september 2015 tot en met 30 juni 2020. De looptijd van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum op uw aanvraag in het verleden ligt.

Wij zijn van mening dat de dierproeven 4 en 5 ('Kunnen stamcellen in kapsels verder rijpen om insuline producerende cellen te worden en kunnen ze daarna de diabetische staat in vivo positief beïnvloeden' en 'Kunnen foetale eilandjes afkomstig van slachtvarkens in kapsels rijpen tot functionele eilandjes van Langerhans en kunnen ze daarna de diabetische staat positief beïnvloeden') niet samenhangen met de andere dierproeven, maar een aparte doelstelling dienen. Een aanvraag mag slechts een doelstelling dienen. De in uw aanvraag beschreven dierproeven 1 t/m 3 richten zich op het verbeteren van de extracellulaire matrix moleculen en de overleving van de geëncapsuleerde eilandjes. De dierproeven 4 en 5 beschrijven onderzoek gedaan aan stamcellen. Wij zien de twee onderzoeklijnen als twee aparte onderzoeksprojecten. Daarom keuren we uw dierproeven 1 t/m 3 goed, maar de dierproeven 4 en 5 moeten als een aparte aanvraag worden ingediend. U mag onder deze vergunning alleen de dierproeven 1 t/m 3 uitvoeren.

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie [redacted] gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons gedeeltelijk vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie gedeeltelijk over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

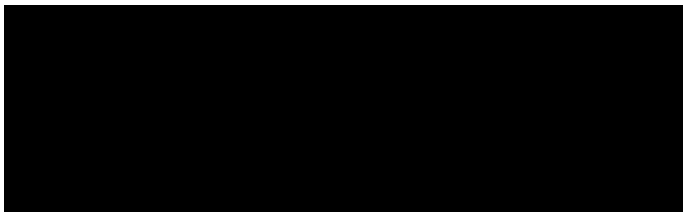
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163.

#### **Bijlagen**

- Vergunning

- Hiervan deeluitmakend: - DEC-advies
- Weergave wet en regelgeving



## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en woonplaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 september 2015 tot en met 30 juni 2020, voor het project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes' met aanvraagnummer [REDACTED] 2015168, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is hoogleraar.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij brief op 8 juli 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 9 juli 2015;
  - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 9 juli 2015 en aangepast op 2 september 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie [REDACTED] d.d. 3 juli 2015 en ontvangen op 9 juli 2015;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juli 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Welke extracellulaire matrix moleculen dragen bij aan een verbeterde overleving van de eilandjes van Langerhans	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	864	Matig en terminaal
Kan door een tijdelijke onderdrukking van de ontstekingsreactie de overleving van geëncapsuleerde eilandjes verder verlengd worden	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	820	Matig en terminaal
Welke polymeren die op grond van uitgebreid in vitro onderzoek zijn geselecteerd kunnen in vivo voorkomen dat op of in de omgeving van de geëncapsuleerde eilandjes een immuunrespons ontstaat die de overleving van de eilandjes negatief beïnvloedt	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	828	Matig en terminaal

### Voorwaarde:

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



**Datum**

2 september 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

[REDACTED] 2015168

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

## Weergave wet- en regelgeving

### Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### 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

**Datum**  
2 september 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
[REDACTED] 2015168

ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 2 september 2015 16:20  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Besluit op aanvraag [REDACTED] 2015168  
**Bijlagen:** AVD2015168\_DEC advies.pdf; Beschikking [REDACTED] 2015168 ondertekend.pdf; Vergunning [REDACTED] 2015168.pdf

Geachte [REDACTED]

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes' met aanvraagnummer [REDACTED] 2015168. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Zie bijgaande brief, die ook nog per post naar u toegezonden is.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

[Redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 9 september 2015 10:39  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling besluit aanvraag [Redacted] 2015168

Beste [Redacted],

Op 3 juli 2015 heeft [Redacted] advies uitgebracht aan de CCD betreffend het project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes', met aanvraagnummer [Redacted] 2015168, uw interne kenmerk: [Redacted]. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft de aanvraag beoordeeld en gedeeltelijk goedgekeurd.

De CCD is van mening dat de dierproeven 4 en 5 ('Kunnen stamcellen in kapsels verder rijpen om insuline producerende cellen te worden en kunnen ze daarna de diabetische staat in vivo positief beïnvloeden' en 'Kunnen foetale eilandjes afkomstig van slachtvarkens in kapsels rijpen tot functionele eilandjes van Langerhans en kunnen ze daarna de diabetische staat positief beïnvloeden') niet samenhangen met de andere dierproeven, maar een aparte doelstelling dienen. Een aanvraag mag slecht een doelstelling dienen. De in deze aanvraag beschreven dierproeven 1 t/m 3 richten zich op het verbeteren van de extracellulaire matrix moleculen en de overleving van de geëncapsuleerde eilandjes. De dierproeven 4 en 5 beschrijven onderzoek gedaan aan stamcellen. De CCD ziet de twee onderzoeklijnen als twee aparte onderzoeksprojecten. Daarom keuren ze de dierproeven 1 t/m 3 goed, maar de dierproeven 4 en 5 moeten als een aparte aanvraag worden ingediend. De aanvrager mag onder deze vergunning alleen de dierproeven 1 t/m 3 uitvoeren.

De aanvrager mag met het project 'Verbetering van de overleving van geëncapsuleerde eilandjes van Langerhans ten behoeve van behandeling van Diabetes' starten, maar alleen met de dierproeven 1 t/m 3. De vergunning wordt afgegeven van 2 september 2015 tot en met 30 juni 2020.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

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

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

.....  
T: 0900 2800028

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.





27 JUL 2015

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 7 5 9 2 4</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>[REDACTED] Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	[REDACTED]	Postbus	[REDACTED]	Postcode en plaats	[REDACTED] Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	[REDACTED]																
Postbus	[REDACTED]																
Postcode en plaats	[REDACTED] Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 8 . 2 0 1 5 |
| Einddatum  | 3 1 . 0 7 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neurale circuits in verslaving en controle over voedselinname
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hersenverbindingen die betrokken zijn bij (eet)verslaving
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |



## 4 Betaalgegevens

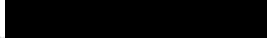
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

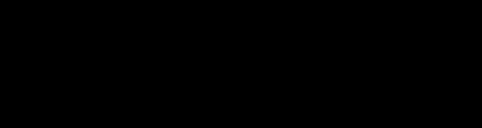
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

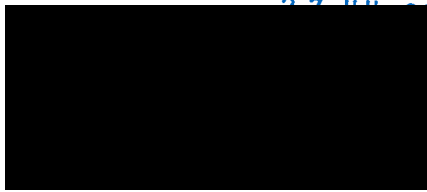
Plaats Utrecht

Datum 22-07-2015

Handtekening 



22 juli 2015



Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres



postadres



uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 22 juli 2015  
onderwerp Aanvraag projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag. *x2*

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan [redacted]  
[redacted] Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van  
de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. [redacted]  
[redacted] Utrecht.

Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na  
ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en  
daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

**Factuuradres**

[redacted]  
[redacted]  
[redacted] Utrecht  
o.v.v. [redacted]

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het  
snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres:  
[redacted]

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 22 juli 2015.

Met vriendelijke groet



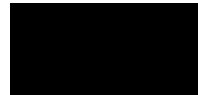


Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres



postadres





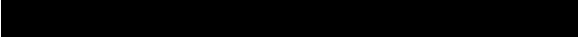

uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 22 juli 2015  
onderwerp Aanvraag projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

#### Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan   
. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van  
de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v.   
 Utrecht.

#### Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

#### **Factuuradres**

  
 Utrecht  
o.v.v. 

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres:



Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 22 juli 2015.

Met vriendelijke groet





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

Verslaving en obesitas vormen grote medische en maatschappelijke problemen. Meer dan 100 miljoen individuen wereldwijd kampen met middelenverslaving problematiek. Middelenverslaving vergroot het risico op secundaire aandoeningen, zoals hart en vaatziekten, verschillende vormen van kanker en verschillende psychiatrische aandoeningen. Middelenverslaving is verantwoordelijk voor meer dan 40% van de kosten die gemoeid zijn met alle grote neuropsychiatrische aandoeningen. Obesitas zorgt voor gezondheidsproblemen bij naar schatting 500 miljoen personen wereldwijd en is verantwoordelijk voor 6% van de overheidskosten voor gezondheidszorg in Europa alleen. Een belangrijk kenmerk van verslaving en – bepaalde vormen van – obesitas, waarbij sprake is van overeten, is controleverlies over middelengebruik en voedselinname (Smith et al, 2013, Biol. Psych.; Volkow et al., 2013, Biol. Psych.; Gearhardt et al, 2011, Curr. Drug Abuse Rev.; American Psychiatric Association; Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed. 2013)). Het belang van onderzoek naar controleverlies blijkt onder meer uit het feit dat wij voor dit neurobiologische onderzoek naar controleverlies over middelengebruik een grote subsidie van ZonMW hebben ontvangen.

De huidige behandelmethoden voor verslaving en obesitas zijn beperkt in aantal en effectiviteit (*for review see* O'Brien, 2008, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.; van den Brink, 2012, Curr. Drug Abuse Rev.; Adan et al., 2013, Trends Neurosci.). Bovendien zijn ze niet gericht op het herstellen van controle over middelengebruik, maar op het reduceren van de belonende effecten of craving naar verslavende middelen of voedsel. Het is daarom van belang beter te begrijpen hoe middelen- en voedselverslaving neurobiologisch tot stand komen en in stand gehouden worden. Dit zal leiden tot nieuwe mogelijkheden om deze aandoeningen adequater te kunnen behandelen.

Voorgaand onderzoek van onszelf en anderen in de afgelopen jaren heeft hersengebieden geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstaan van verslaving. Daarnaast zijn er steeds meer aanwijzingen dat hersenstructuren die betrokken zijn bij het vormen van gewoontes en bij cognitieve controle over gedrag bijdragen aan verslavingsproblematiek. Echter, er is nog weinig bekend over de neurale circuits die betrokken zijn bij middelen- en voedselverslaving, laat staan bij het ontstaan van controleverlies over middelengebruik of voedselinname. In dit project wordt daarom onderzocht welke neurale circuits, individuele hersengebieden maar ook de connecties tussen hersengebieden, bijdragen aan controleverlies over middelengebruik en voedselinname.

### Eerdere resultaten

In de afgelopen jaren hebben wij veel geïnvesteerd in betrouwbare en relevante diermodellen voor verslaving en overeten. Wij hebben bijvoorbeeld laten zien dat dieren, na langdurig gebruik van cocaïne, alcohol of voedsel met een hoge calorische waarde (palatable food), niet alleen veel van deze stoffen of voedsel innemen maar ook controle over hun gebruik verliezen. Ze blijven bijvoorbeeld zoeken naar cocaïne, alcohol of palatable food in conflictsituaties, waarin ze zoeken naar het middel of naar voedsel en tegelijkertijd geconfronteerd worden met een waarschuwingssignaal dat een footshock voorspelt (zie bijv. Vanderschuren and Everitt, 2004, Science 305: 1017-1019; de Jong et al., 2013, PLoS One; Limpens et al., 2014, Drug Alcohol Depend. 142: 314-24). Dit geeft aan dat de dieren compulsief gebruik van verslavende middelen maar ook van voedsel ontwikkelen, een belangrijk kenmerk van verslaving. Bovendien zien we grote individuele verschillen in de gevoeligheid voor verslaving. In populaties ██████████ ratten kunnen we subgroepen van hoge en lage alcohol drinkende dieren onderscheiden. Recent hebben we bovendien gevonden dat hoge alcohol drinkende ratten sneller minder gevoelig worden voor kinine

toevoeging en voor een waarschuwingssignaal [REDACTED], wat erop wijst dat deze dieren compulsief alcoholgebruik laten zien. Deze resultaten worden momenteel opgeschreven voor publicatie. Met deze modellen hebben wij en anderen onder meer laten zien dat de prefrontale cortex belangrijk is voor het in stand houden van controle over cocaine gebruik (bijv. Chen et al., 2012, Nature; Limpens et al., 2014, Brain Res). Verder zijn er aanwijzingen in de literatuur dat de nucleus accumbens en subregio's in het dorsale striatum bijdragen aan controleverlies over middelengebruik en voedselinname (bijv. Seif et al., 2013, Nature Neurosci; Corbit et al., 2012, Biol. Psychiatry; Furlong et al., 2014, J. Neurosci). Deze studies laten ook zien dat de hersenen veranderen onder invloed van verslavende middelen, en mogelijk ook voedsel, waardoor een individu de controle over het gebruik van verslavende middelen en voedsel verliest.

De diermodellen die wij en anderen ontwikkeld hebben stellen ons in staat om de mechanismen van controleverlies over middelengebruik en voedselinname te bepalen. Geavanceerde technieken [REDACTED]

[REDACTED] stellen ons bovendien in staat om in een hoge mate van detail en met een hoge tijdsresolutie specifieke hersencircuits te onderzoeken in het ontstaan en tot stand houden van controleverlies over middelengebruik en voedselinname. Deze kennis is nodig en kan bijdragen aan betere behandelmethoden, waarbij [REDACTED] specifieke circuits in de hersenen behandeld kunnen worden.

Samengevat hebben wij belangrijk voorwerk gedaan in de afgelopen jaren waarin we laten zien dat we met behulp van de rat als diermodel onderzoek kunnen doen naar controleverlies over middelengebruik en voedselinname, een kernkenmerk van verslaving en obesitas. Met behulp van deze modellen wordt in dit project onderzoek gedaan naar de circuits in de hersenen die hierbij betrokken zijn.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

De in dit project beschreven experimenten hebben als doel om de neurale circuits op te helderen die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname.

We richten ons in dit project op twee verslavende middelen en voedsel omdat bekend is (zoals hierboven beschreven) dat obesitas en middelenslaving gekenmerkt worden door controleverlies over voedselconsumptie en gebruik van verslavende middelen. Echter, er is nog weinig bekend over de neurobiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan controleverlies over voedselinname en verslavende middelen. We kiezen ervoor om dit project te focussen op voedsel, een natuurlijke beloner, en twee verslavende middelen: cocaïne en alcohol, vanwege het sterke verslavende vermogen van deze middelen en de enorme maatschappelijke schade die de misbruik van deze middelen veroorzaakt. Daarentegen zijn de primaire effecten van cocaïne en alcohol op neurotransmissie verschillend (cocaïne remt de dopamine heropname transporter, terwijl alcohol voornamelijk werkt als allosterische modulator van GABA receptoren), en is cocaïne illegaal terwijl het gebruik van alcohol legaal en zelfs breed geaccepteerd is in onze maatschappij. Bovendien is preklinisch onderzoek naar controleverlies over middelengebruik voornamelijk gericht op cocaïne en alcohol, maar is niet duidelijk of de neurobiologische mechanismen voor controleverlies over het gebruik van cocaïne en alcohol vergelijkbaar is.

Wij hebben alle expertise en methoden in huis (zie ook 3.1, achtergrond) om deze experimenten uit te voeren. Wij werken intensief samen met nationale partners, die onderzoek doen naar verslaving bij mensen. Ons proefdierexperimenteel werk sluit nauw aan bij dit onderzoek, en is in die zin vertaalbaar naar humaan werk.

### 3.3 Belang

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

De in dit project beschreven experimenten zijn gericht op het ophelderen van de neurale circuits die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik (cocaine en alcohol) en voedselinname.

Middelenverslaving, aan stoffen zoals cocaine of alcohol, vormt een groot medisch en maatschappelijk probleem. Meer dan 100 miljoen individuen wereldwijd kampen met middelenverslaving problematiek. Middelenverslaving is verantwoordelijk voor meer dan 40% van de financiële kosten die gemoeid zijn met alle grote neuropsychiatrische aandoeningen. Obesitas zorgt voor gezondheidsproblemen bij naar schatting 500 miljoen personen wereldwijd en is verantwoordelijk voor 6% van de overheidskosten voor gezondheidszorg in Europa alleen. Een belangrijk kenmerk van verslaving en obesitas is controleverlies over middelengebruik en voedselinname.

De huidige behandelmethoden voor verslaving en obesitas zijn beperkt in aantal en effectiviteit. Bovendien zijn ze niet gericht op het herstellen van controle over middelengebruik. Het is daarom van belang beter te begrijpen hoe middelen- en voedselverslaving neurobiologisch tot stand komen en in stand gehouden worden. Dit onderzoek zal inzicht geven in de mechanismen die bijdragen aan verslaving. Opheldering van deze mechanismen factoren is van groot belang voor het ontwikkelen van betere behandelmethoden voor verslaving en obesitas. Dit onderzoek richt zich hier op en zal inzicht geven in de mechanismen die bijdragen aan middelenverslaving en obesitas. Dit zal daarom kunnen leiden tot nieuwe mogelijkheden om deze desastreuze aandoeningen adequater te kunnen behandelen.

Voor dit project, [REDACTED] werken wij samen met nationale en internationale partners, waaronder verslavingsartsen [REDACTED]. Deze samenwerkingen maken het mogelijk om onze bevindingen op termijn in te zetten in de verbetering van klinische behandelmethoden voor verslaving en – bepaalde vormen van - obesitas.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

In dit project worden de neurale circuits die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname onderzocht.

Om dit te kunnen doen moeten we twee fasen doorlopen:

1. De anatomische projecties in de te bestuderen circuits moeten onderzocht worden door middel van histologische analyses. Daarnaast moeten de te gebruiken [REDACTED] manipulaties in deze circuits geverifieerd en geoptimaliseerd worden.
2. De ratten worden blootgesteld aan cocaine, alcohol of voedsel en worden vervolgens getest op de mate van controle over cocaine, alcohol of voedselinname. Vervolgens wordt door [REDACTED] manipulaties in specifieke hersengebieden of circuits de rol van deze neurale systemen in controle(verlies) over cocaine, alcohol of voedsel inname bepaald.

De keuze voor een bepaald soort neuronale projectie zal gedaan worden op basis van literatuur en (deels reeds uitgevoerde) anatomische studies.

### Deel 1A



We beginnen met het in kaart brengen en valideren van anatomische connecties van deze gebieden. Vervolgens willen we de manipulatie van deze neuronale connecties [redacted] valideren met behulp van in vitro elektrofysiologie.

[redacted]

[redacted] Voor iedere te valideren anatomische projectie wordt het meest geschikte virus in het gebied van een of meerdere ratten geïnfuseerd door middel van een stereotactische microinfusie. Vervolgens worden, na een periode van enkele weken, de hersenen na fixatie uitgenomen en met behulp van immunohistochemische analyse bestudeerd.

De manipulatie van de te bestuderen anatomische connecties [redacted] wordt met in vitro elektrofysiologie gevalideerd. Hiervoor wordt steeds een [redacted] injectie geplaatst in het hersengebied van interesse. Na een periode van enkele weken worden de hersenen uitgenomen en wordt met behulp van elektrofysiologie (patch clamp en current clamp) bepaald of de neuronale activiteit in het (projectie)gebied van interesse [redacted] geremd of gestimuleerd wordt.

## Deel 1B

Om de rol van specifieke hersengebieden en anatomische connecties tussen hersengebieden in controle over cocaïne, alcohol of voedselinname te bestuderen wordt gebruik gemaakt van een gedragstaak, waarbij de dieren eerst cocaïne, alcohol of hoog calorisch voedsel krijgen aangeboden gedurende een bepaalde periode. Dit gebeurt in de thuishooi (alcohol en soms ook voor voedsel) of in operante boxen (i.v. cocaïne, oraal voedsel). Daarna ondergaan alle dieren een operatie, [redacted] dit is afhankelijk van de specifieke vraagstelling.

Voor het bepalen van de mate van controle(verlies) over cocaïne, alcohol of voedselinname wordt gebruik gemaakt van [redacted] suppressie. Hiervoor worden de dieren eerst getraind na training om op een pedaal te drukken voor een middel (cocaïne, alcohol) of voedsel in operante kooien. Vervolgens wordt bepaald in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar het middel of voedsel aanpast als een waarschuwingssignaal, [redacted], wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. Verlies van [redacted] suppressie wijst op controleverlies over gebruik van het middel of voedsel.

Door op verschillende tijdstippen tijdens de operante zelftoediening voor cocaïne, alcohol of voedsel of tijdens [redacted] suppressie neuroanatomische projecties te remmen of stimuleren, kan het effect van de verschillende projecties op de belonende effecten van, motivatie voor of controle over het gebruik van cocaïne, alcohol of voedsel worden beïnvloed.

(zie 3.4.2. voor verdere details)

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

---

Deel 1A: Anatomie en elektrofysiologie

Diersoort: Lister Hooded of Wistar rat

Doel: In kaart brengen van anatomische projecties in de te bestuderen circuits en validatie / optimalisatie van [REDACTED] manipulaties in deze circuits.

Deel 1B: [REDACTED] manipulatie van controle over cocaine, alcohol en voedselinname

Diersoort: Lister Hooded of Wistar rat

Doel: Het in kaart brengen van neurale circuits die bijdragen aan controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname

---

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

---

Het is voor dit onderzoek van groot belang om eerst de anatomie van de neuronale circuits in kaart te brengen (deel 1A), hierna de functionaliteit van de manipulatie van de neuronale circuits te bepalen (gedekt door de in vitro elektrofysiologie, deel 1B) en vervolgens de functionaliteit van deze neuronale circuits in de controle over cocaine, alcohol en voedselinname te bepalen ([REDACTED] deel 2).

Onderdeel 1 wordt eerst deels doorlopen, Onderdeel 2 wordt gefaseerd opgestart met de condities die in onderdeel 1 (deze dierproeven) bepaald zijn.

Samen stellen deze dierproeven ons in staat om op een uiterst betrouwbare wijze uitspraken te kunnen doen over de neuronale circuits die betrokken zijn bij verslaving en obesitas.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Anatomie en elektrofysiologie
2	manipulatie van controle over cocaine, alcohol en voedselinname
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Anatomie en elektrofysiologie</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Anatomie en elektrofysiologie
Volgnummer	Type dierproef					
1	Anatomie en elektrofysiologie					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De in dit project beschreven experimenten hebben als doel om de neurale circuits op te helderen die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname.

In dit deel van het project brengen we de anatomische connecties van relevante hersengebieden voor controle over middelengebruik en voedselinname, op basis van literatuur en voorgaand onderzoek (zie projectvoorstel, achtergrond), in kaart. [REDACTED]

[REDACTED] Daarnaast wordt een deel van deze dierproeven uitgevoerd om de manipulatie van deze

neuronale connecties [redacted] te valideren met behulp van in vitro elektrofysiologie.

[redacted]

De virussen, die gebruikt worden [redacted] brengen [redacted] een reporter gen zoals YFP tot expressie. Dit maakt het mogelijk om deze virussen te benutten om anatomische connecties in kaart te brengen. Voor iedere te valideren anatomische projectie wordt het meest geschikte virus in het gebied van een of meerdere ratten geïnfuseerd door middel van een stereotactische microinfusie. Vervolgens worden, na een periode van enkele weken, de hersenen na fixatie uitgenomen en met behulp van immunohistochemische analyse bestudeerd. De primaire uitkomstparameter is de **mate van en locatie van expressie van het reporter gen**, dat aangeeft waar de [redacted]-gevoelige celpopulaties zich bevinden (deel 1A).

De manipulatie van de te bestuderen anatomische connecties [redacted] wordt met in vitro elektrofysiologie gevalideerd. Hiervoor wordt steeds een virusinjectie geplaatst in het hersengebied van interesse. Na een periode van enkele weken worden de hersenen uitgenomen en wordt met behulp van elektrofysiologie bepaald of de **neuronale activiteit**, de primaire uitkomstparameter, in het (projectie)gebied van interesse [redacted] geremd of gestimuleerd wordt (deel 1B).

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.

- Operaties: injectie met een [redacted] virus / [redacted] Een deel van de dieren (~50%) zal voor een tweede keer geopereerd moeten worden om dat de expressie [redacted] afhankelijk kan zijn van andere virussen en het kost tijd om de eerste tot expressie te laten komen, zoals bijvoorbeeld de TVA receptor voor sommige gemodificeerde rabies virussen).
- Individuele huisvesting (na [redacted] operatie, nodig om te voorkomen dat de dieren aan elkaars wonden knagen)
- Euthanasie:
  - Voor anatomische analyses i.p. injectie gevolgd door perfusie en fixatie (~50% van de dieren)
  - Voor elektrofysiologische analyses decapitatie (onder anesthesie)

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

De anatomische en elektrofysiologische analyses worden uitgevoerd voor elke projectie die [redacted] onderzocht wordt (deel 2). Dit zijn ~15 projecties. Deze projecties zullen gekozen worden op basis van literatuur, eerder uitgevoerde anatomische studies, en (gedurende de komende vijf jaar) op basis van tussentijdse onderzoeksresultaten. Per projectie verwachten we ~4 dieren te willen onderzoeken voor anatomie en nog eens 8 dieren voor elektrofysiologische validatie van de [redacted] manipulaties; alle bepalingen en vergelijkingen zijn within-animal, dus er is hier geen sprake van groepen. Daarbij komt nog ~15% extra dieren voor het verifiëren van hersencoördinaten; dit maakt  $4+8+2=14$  dieren per projectie en een totaal van 210 ratten. Overigens is deze informatie van toepassing voor de verschillende verslavende stoffen die in dierproef 2 onderzocht worden; iedere anatomische en elektrofysiologische karakterisatie hoeft dus slechts een maal gevalideerd worden.

## B. De dieren

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

210 ratten, man, ██████████.

Er bestaan uitstekende modellen met ratten om verslavingsgedrag te bestuderen. Wij hebben uitgebreide ervaring met het bestuderen van verslavingsgedrag bij ratten, waarbij we voornamelijk ██████████ ratten maar in sommige gevallen ook ██████████ ratten gebruiken. De cognitieve capaciteit van de ██████████ rat maakt deze rattenstam zeer geschikt voor onze complexe cognitieve en operante taken, waardoor de trainingsduur voor deze taken korter is. Aangezien voorgaande studies gebaseerd zijn op resultaten met de ██████████ rat en soms ook ██████████ ratten, zullen we afhankelijk van de vraagstelling voornamelijk ██████████ maar soms ook ██████████ ratten gebruiken voor dit project.

Wij kiezen bewust om in deze fase van ons onderzoek alleen mannen te gebruiken. Ten eerste komt verslaving vaker voor bij mannen dan bij vrouwen. Alcoholverslaving komt bijvoorbeeld ongeveer twee keer zo vaak voor bij mannen dan bij vrouwen (bijv. Nationale Drugs Monitor 2011, Trimbos Instituut). Prevalentiecijfers voor obesitas laten ook zien dat obesitas vaker voorkomt in mannen dan vrouwen (bijv. rapport NHG website). Bovendien is het bekend dat mannen en vrouwen verschillen in de hoeveelheid middelengebruik. Deze sekse verschillen zouden dit onderzoek in deze fase – dat als primaire doel heeft om te bepalen wat de mechanismen zijn die bijdragen aan verslaving – nadelig beïnvloeden. Ten derde is onze keuze ook methodologisch – de alcoholconsumptiemodellen die in de afgelopen periode ontwikkeld zijn en mede de basis vormen voor dit onderzoek zijn uitgevoerd in mannen. Indien we voor vrouwen zouden kiezen zou al dit voorwerk ook opnieuw uitgevoerd moeten worden, wat in ieder geval in deze fase van de studie voorbij gaat aan het primaire doel van dit onderzoek. Afhankelijk van de uitkomsten van ons onderzoek zullen wij in de toekomst overwegen om ook naar vrouwen te kijken, maar de relatieve relevantie van onderzoek bij mannen is momenteel nog zo hoog dat we daar vooralsnog niet voor kiezen.

De dieren zullen allemaal op volwassen leeftijd (8-10 weken oud) besteld worden. Omdat deze experimenten zo bepalend zijn voor de vervolgentoetsen willen we naïeve dieren gebruiken voor deze fase van de studie. We willen voorkomen dat de resultaten nadelig beïnvloedt kunnen worden door voorgaande behandelingen, bijvoorbeeld door aanpassingen in de hersenen.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de

keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vermindering:

- In het kader van vermindering is het niet mogelijk om surplusdieren te gebruiken omdat de dieren naïef moeten zijn voor deze experimenten.
- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat verslaving en obesitas vaker voorkomen in mannen dan in vrouwen. Bovendien zijn onze eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en om garanderen dat de vindingen met deze voorgaande studies vergeleken kunnen worden zonder al voorwerk in vrouwen te moeten herhalen is het ook van belang om deze studie weer mannen te gebruiken.
- Het doel van de hier beschreven dierproeven is om de condities voor de experimenten in deel (2) van dit project te optimaliseren. Dit vergroot de betrouwbaarheid van de experimenten in deel (2) en draagt in die zin bij aan vermindering van het aantal dieren dat op de lange termijn nodig is voor dit onderzoek.

Verfijning:

- Vanwege de aard van onze experimenten worden de dieren veelal dagelijks zeer intensief gecontroleerd door onderzoekers waar de dieren aan gewend zijn. Daardoor kunnen wij de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afstemmen.
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie

Vervanging:

- Omdat we kijken naar de hersenen en complexe circuits in de hersenen, zijn er geen alternatieve (in vitro) methoden.
- Humaan onderzoek kan het hier beschreven onderzoek niet vervangen omdat bij de mens geen manipulaties van specifieke neuronale circuits mogelijk zijn zoals noodzakelijk voor dit onderzoek en beschreven in dit project.

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

Perioperatieve zorg en pijnbestrijding, kooiverrijking.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Dit is nagegaan door literatuuronderzoek.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer

de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

Na [REDACTED] operatie moeten dieren individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat de dieren aan elkaars wonden knagen.

#### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Individuele huisvesting (nodig na microinfusies) en operatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De individuele huisvesting en operatie zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Perioperatieve zorg.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.



Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht). Op basis van klinische verschijnselen (immobiliteit, verminderde reactie en piloerectie) worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.  
- Motorische uitval of lethargie na operatie.

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

Maximaal 2% loopt na operatie de kans de beschreven criteria voor het humane eindpunt te bereiken.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Het meeste ongerief zullen de dieren ondervinden van de operatie (matig).  
Individuele huisvesting geeft licht ongerief.

We classificeren het ongerief op matig.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Doden is noodzakelijk om de anatomische projecties en manipulatie daarvan te kunnen bepalen, wat het doel van deze dierproeven is.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="manipulatie van controle over cocaine, alcohol en voedselinname"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De in dit project beschreven experimenten hebben als doel om de neurale circuits op te helderen die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname.

In dit deel van het project brengen we neurale circuits in kaart die bijdragen aan controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname.

[REDACTED]

Door specifieke projecties te manipuleren in een gedragstaak waarin we kijken naar de controle van ratten over cocaïne, alcohol of voedselinname kunnen de functionele rol van deze projecties in de controle over middelengebruik of voedselinname bepalen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een [REDACTED] suppressie test. Hierbij worden de ratten getraind om te drukken voor een verslavende stof (alcohol of cocaïne) of voor hoog calorisch voedsel in operante kooien. Vervolgens wordt bepaald in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar het middel (alcohol of cocaïne) of naar voedsel aanpast als een waarschuwingssignaal, [REDACTED], wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. De kritische uitkomstparameters zijn het **aantal pedaaldrukken en verlies van [REDACTED] suppressie**, dat bepaald wordt door vergelijking van het aantal pedaaldrukken door [REDACTED] dieren in dezelfde behandelgroep, en wijst op controleverlies over ofwel compulsief middel gebruik danwel voedselinname.

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.

- Operaties: [REDACTED] Een deel van de dieren (~50%) zal voor een tweede keer geopereerd moeten worden om dat de expressie [REDACTED] afhankelijk kan zijn van andere virussen en het kost tijd om de eerste tot expressie te laten komen, zoals bijvoorbeeld de TVA receptor voor sommige gemodificeerde rabies virussen).
- Specifiek voor alcohol experimenten: alcoholconsumptie in de thuishooi (8-16 weken).
- Specifiek voor cocaïne: vena jugularis cannulaties onder injectie anesthesie (gecombineerd met AAV infusies / plaatsing van optische fibers)
- Specifiek voor voedsel: om de dieren gemotiveerd te maken voor de operante taak is voedselrestrictie tot 85-90% van het vrijvoer gewicht noodzakelijk (dagelijks maar zodanig dat het lichaamsgewicht niet meer dan 10% daalt ten opzichte van de groeicurve).
- Operante zelftoediening voor cocaïne, alcohol of voedsel (max. 20 weken)
- Trainen van de dieren voor [REDACTED] suppressie: toon associaties met milde footschokken (max. 4 sessies per dier)
- [REDACTED] suppressie test: cocaïne, alcohol of voedsel zelftoediening met/zonder toon (4-12 sessies per dier)
- Individuele huisvesting (noodzakelijk na operaties om schade aan kapjes en vena jugularis cannule te voorkomen en nodig voor bepaling van individuele alcohol of voedsel inname niveaus)
- Euthanasie: i.p. injectie gevolgd door perfusie en fixatie (voor post-mortem verificatie van virus infusies en plaatsing fibers)

In het geval van [REDACTED], aanvullend:

- Implanteren [REDACTED]: 1x tijdens operatie (na een periode van enkele weken, afhankelijk van het experiment, van zelftoediening van voedsel, cocaïne of alcohol)
- [REDACTED] aansluiten [REDACTED]: tijdens operante taak

In het geval van [REDACTED] aanvullend:

- Injectie met [REDACTED]

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

De [REDACTED] analyses worden uitgevoerd voor ~15 projecties.

De belangrijkste parameter in deze experimenten is steeds de mate van controle over alcohol-, cocaine- of voedselzoekgedrag, die blijkt uit de mate van [REDACTED] suppressie in het aantal responsen die de dieren maken voor alcohol of cocaine. Met een verwacht verschil van 4.6 responsen en een standaard deviatie van 4.2 is een groepsgrootte van 14 ratten nodig om de kans op vals negatieve resultaten tot minder dan 20% te reduceren (power van 80% en een alpha van 0.05). Deze berekening is gemaakt met behulp van de online power calculator (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>).

Voor de [REDACTED] suppressie is een [REDACTED] controlegroep [REDACTED] nodig en verder moet nog een derde groep worden meegenomen met een controle virus [REDACTED]. In totaal zijn daarom per projectie  $3 \times 14 = 42$  ratten nodig. Vanwege operaties (mogelijk uitval) en pilotten van experimenten (om op basis van deze pilots een betere groepsschatting te kunnen doen) en het inwerken van werknemers vragen we 5% extra dieren aan. In totaal komen we dan op 44 dieren per projectie voor cocaine en voedselexperimenten.

Voor de alcohol experimenten moeten we bovendien rekening houden met individuele variatie in alcoholinname tussen ratten, waarbij we op basis van uiterste kwartielen hoge en lage alcohol drinkende ratten kunnen onderscheiden. Dit betekent dat voor alcohol experimenten  $4 \times 44 = 176$  dieren per projectie nodig zijn.

Op basis van ervaring vragen we in totaal  $(44 \times 2 + 176) \times 15 = 3960$  dieren aan om maximaal ~15 projecties voor zowel cocaine als alcohol als voedsel te kunnen onderzoeken. Deze projecties zullen gekozen worden op basis van literatuur, eerder uitgevoerde anatomische studies, en (gedurende de komende vijf jaar) op basis van tussentijdse onderzoeksresultaten.

---

## B. De dieren

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

3960 ratten, man, [REDACTED] of [REDACTED]

De modellen die we hier gebruiken, [REDACTED] suppressie van consumptie van voedsel of zelftoediening van cocaine of alcohol, is een uitstekend model om verslavingsgedrag in ratten te bestuderen, juist om dat het gericht is op controle over voedsel of middelengebruik, wat een belangrijk kernkenmerk van verslaving en obesitas is. Wij hebben uitgebreide ervaring met het bestuderen van verslavingsgedrag bij ratten, waarbij we voornamelijk [REDACTED] ratten maar in sommige gevallen (bijvoorbeeld voor cocaine) ook [REDACTED] ratten gebruiken. De cognitieve capaciteit van de [REDACTED] rat maakt deze rattenstam zeer geschikt voor onze complexe cognitieve en operante taken, waardoor de trainingsduur voor deze taken korter is. Aangezien voorgaande studies gebaseerd zijn op resultaten met de [REDACTED] rat en soms ook [REDACTED] ratten, zullen we afhankelijk van de vraagstelling voornamelijk [REDACTED] maar soms ook [REDACTED] ratten (voor cocaine of voedsel experimenten) gebruiken voor dit project.

Wij kiezen bewust om in deze fase van ons onderzoek alleen mannen te gebruiken. Ten eerste komt verslaving vaker voor bij mannen dan bij vrouwen. Alcoholverslaving komt bijvoorbeeld ongeveer twee keer zo vaak voor bij mannen dan bij vrouwen (bijv. Nationale Drugs Monitor 2011, Trimbos Instituut). Prevalentiecijfers voor obesitas laten ook zien dat obesitas vaker voorkomt in mannen dan vrouwen (bijv. rapport NHG website). Ten tweede is het bekend dat mannen en vrouwen verschillen in de hoeveelheid middelengebruik. Deze sekse verschillen zou dit onderzoek in deze fase – dat als primaire doel heeft om te bepalen wat de mechanismen zijn die bijdragen aan verslaving – nadelig beïnvloeden. Ten derde is onze keuze ook methodologisch – de

alcoholconsumptiemodellen die in de afgelopen periode ontwikkeld zijn en mede de basis vormen voor dit onderzoek zijn uitgevoerd in mannen. Indien we voor vrouwen zouden kiezen zou al dit voorwerk ook opnieuw uitgevoerd moeten worden, wat in ieder geval in deze fase van de studie voorbij gaat aan het primaire doel van dit onderzoek. Afhankelijk van de uitkomsten van ons onderzoek zullen wij in de toekomst overwegen om ook naar vrouwen te kijken, maar de relatieve relevantie van onderzoek bij mannen is momenteel nog zo hoog dat we daar vooralsnog niet voor kiezen.

De dieren zullen allemaal op volwassen leeftijd (8-10 weken oud) besteld worden.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vermindering:

- In het kader van vermindering is het niet mogelijk om surplusdieren te gebruiken omdat de dieren naïef moeten zijn voor deze experimenten.
- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat verslaving en obesitas vaker voorkomen in mannen dan in vrouwen. Bovendien zijn onze eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en om garanderen dat de vindingen met deze voorgaande studies vergeleken kunnen worden zonder al voorwerk in vrouwen te moeten herhalen is het ook van belang om deze studie weer mannen te gebruiken.
- Door in deel (1) van dit project de condities voor de experimenten in dit deel (2) van het project te optimaliseren wordt de betrouwbaarheid van de experimenten aanzienlijk vergroot. Dit draagt bij aan vermindering van het aantal dieren dat op de lange termijn nodig is voor dit onderzoek.

Verfijning:

- Vanwege de aard van onze experimenten worden de dieren veelal dagelijks zeer intensief gecontroleerd door onderzoekers waar de dieren aan gewend zijn. Daardoor kunnen wij de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afstemmen.
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie
- Antibiotisch cement om uitval door infecties onder kapjes te voorkomen en vermijdt gebruik van systemische antibiotica die je anders zou geven
- We gebruiken zeer geavanceerde methoden waardoor veel gedetailleerde informatie uit een dier wordt verzameld

Vervanging:

- Omdat we kijken naar de hersenen en complexe circuits in de hersenen, zijn er geen alternatieve (in vitro) methoden.
- Humaan onderzoek kan het hier beschreven onderzoek niet vervangen omdat bij de mens geen manipulaties van specifieke neuronale circuits mogelijk zijn zoals noodzakelijk voor dit onderzoek en beschreven in dit project.

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

Perioperatieve zorg en pijnbestrijding, kooiverrijking. De dieren gebruiken vrijwillig alcohol of cocaïne of kunnen voedsel krijgen tijdens het uitvoeren van de operante taak.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren kunnen niet met soortgenoten worden gehuisvest omdat we dan geen alcoholinname per rat kunnen bepalen, omdat de ratten elkaars vena jugularis cannules kunnen beschadigen (in het geval van cocaine experimenten) of omdat ze elkaars kapjes [REDACTED] kunnen beschadigen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Individuele huisvesting (voor bepaling alcoholinname en voor bescherming van vena jugularis cannule of head caps na stereotactische ingreep), milde voetschokken, operatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individuele huisvesting, milde voetschokken en operatie zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Perioperatieve zorg.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht). Op basis van klinische verschijnselen (immobiliteit, verminderde reactie en piloerectie) worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.

- Motorische uitval of lethargie na operatie.

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

Maximaal 2% loopt na operatie de kans de beschreven criteria voor het humane eindpunt te bereiken.

### K. Classificatie van ongerief

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

- Het meeste ongerief zullen de dieren ondervinden van de operatie(s) (matig ongerief).

- Het grootste deel van het experiment zal bestaan uit operante ██████████ waar geen ongerief aan ondervonden wordt.
- Incidenteel krijgen dieren milde voetschokken wat licht ongerief kan geven.
- Individuele huisvesting geeft licht ongerief.

Hoewel er op basis van voorgaande studies bij de gebruikte doseringen voor cocaïne en alcohol geen sprake is van zichtbare tekenen van ontweningsverschijnselen, kunnen we niet uitsluiten dat de dieren toch licht ongerief ondervinden door onttrekking.

Cumulatief classificeren we het ongerief op matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Doden is noodzakelijk om de locatie van de virusinjecties en fibers post-mortem te verifiëren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015188

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Op 22 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Neurale circuits in verslaving en controle over voedselinname met aanvraagnummer AVD108002015188.

#### **DEC advies gevraagd**

Uw aanvraag is naar Academische Dierexperimentencommissie Utrecht gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Uw aanvraag wordt door een andere dan de door u aangegeven DEC van een advies voorzien. andere gegevens

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.818.012
2. Titel van het project : Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname
3. Titel van de NTS : Individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 21-05-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 03-06-2015  
 anderszins behandeld: per email 19-06-2015 en 14-07-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 09-06-2015 tot 19-06-2015, 10-07-2015 tot 13-07-2015,  
14-07-2015 tot 14-07-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 17-07-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 09-06-2015, 10-07-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

NTS, 09-06-2015:

- 3.1, achtergrond: Kunt u in iets meer detail aangeven wat het (bredere) doel is van het ZonMW-project waarin u participeert en welke bijdrage u met uw onderzoek levert aan dat project? Dit zou de commissie kunnen helpen bij het goed inschatten van het belang van uw projectaanvraag.

Projectvoorstel, 09-06-2015:

- 3.1, achtergrond: De DEC is van mening dat u de woorden obesitas en 'dik worden' zou moeten vermijden, omdat dit onderzoek over verlies van controle gaat, met focus op eetverslaving, en dit niet hetzelfde is als obesitas en er ook niet mee hoeft samen te hangen. Graag uw visie hierop en zo nodig aanpassen, ook in de Niet Technische Samenvatting.
- 3.2, doel: De DEC verzoekt u duidelijker uit te leggen wat u bedoelt met respectievelijk primaire werkingsmechanismen en onderliggende mechanismen. Graag aanpassen.

Bijlage 2:

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij de berekening van het aantal benodigde dieren rekent u met 42 dieren, maar volgens de DEC moet dit 44 zijn. Mocht dit kloppen, dan verzoekt de DEC u dit in zowel punt A als B aan te passen.

Projectvoorstel, 10-07-2015:

- In uw aanvraag 2015.I.818.011 heeft u het over 'milde voetschokken'. In deze aanvraag over 'voetschokken'. Zit hier verschil tussen? Zo niet, dan raad ik je aan ook in deze aanvraag over 'milde voetschokken' te spreken.
- K. Classificatie van ongerief, bijlage 1: Ook hier graag aangeven dat het individueel huisvesten licht ongerief veroorzaakt, net zoals in bijlage 2 is gedaan.
- K. Classificatie van ongerief, bijlage 2: De DEC is van mening dat er wel degelijk sprake is van ontwenning en verzoekt u dit op te nemen in de tekst, waarbij u ook het ongerief classificeert.

- Datum antwoord: 19-06-2015, 13-07-2015, 14-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

NTS, 19-06-2015:

- 3.1, achtergrond: Er is geen groter doel van het ZonMW project. Deze aanvraag beslaat in zijn geheel de in het project beschreven experimenten en de doelstelling is in het geheel het doel van het ZonMW project. Ik heb een zinsnede toegevoegd aan de NTS om duidelijk te maken dat dit project gefinancierd wordt door ZonMW.

Projectvoorstel, 19-06-2015:

- 3.1, achtergrond: Obesitas zou inderdaad geïnterpreteerd kunnen worden als een bredere term die niet alleen controleverlies over voedselinname beslaat maar bijvoorbeeld ook

veroorzaakt kan worden door stofwisselingsproblemen. Om dit duidelijk te maken is in de eerste alinea van de achtergrond de zin wat uitgebreider en met meer nuance opgeschreven: *Een belangrijk kenmerk van verslaving en – bepaalde vormen van – obesitas, waarbij sprake is van overeten, is controleverlies over middelengebruik en voedselinname. In de verdere tekst heb ik dit doorgevoerd en mij zoveel mogelijk beperkt tot het gebruik van ‘controleverlies over voedselinname’.* In de NTS is dit ook aangepast: *Patiënten die verslaafd zijn hebben geen controle meer over hun gebruik van middelen of – bij bepaalde vormen van obesitas waar sprake is van over eten - hun inname van voedsel.*

- 3.2, doel: Met primaire werkingsmechanismen wordt bedoeld de directe aangrijpingspunten van alcohol en cocaïne. Cocaïne beïnvloedt dopamine transmissie door aan de dopamine heropname transporter (DAT) te binden en deze te remmen, waardoor er meer dopamine in de synaptische spleet blijft. Alcohol daarentegen werkt voornamelijk als allosterische modulator van GABA-receptoren, waardoor GABAerge neurotransmissie gestimuleerd wordt. Deze toelichting is aan de tekst toegevoegd om dit te verduidelijken en verder is ‘primaire werkingsmechanismen’ veranderd in ‘primaire effecten op neurotransmissie’. Van ‘onderliggende mechanismen’ is ‘neurobiologische mechanismen’ gemaakt om verdere verwarring helemaal uit te sluiten.

Bijlage 2:

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Dank voor het opmerken van deze vergissing, het moet inderdaad 44 zijn (totale aantal dieren voor cocaïne / voedsel experimenten). Voor alcohol experimenten zijn steeds 176 dieren nodig. Het totale aantal dieren komt hierdoor op  $(44*2+176)*15 = 3960$ , dit is aangepast in deze bijlage en ook in de NTS.

Projectvoorstel, 13-07-2015:

- De opmerking over de milde voetschokken, is aangepast in de bijlagen en het projectvoorstel.
- K. Classificatie van ongerief: In bijlage 1 is nu ook licht ongerief door individueel huisvesten vermeld.
- K. Classificatie van ongerief: Dit is aangepast. Er staat nog wel dat er geen zichtbare tekenen van ongerief zijn op basis van eerdere studies, maar dat licht ongerief door onttrekking niet kan worden uitgesloten.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

- Expert advies:

### **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. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ophelderen van het verband tussen de neurale circuits die betrokken zijn bij (het verlies van) controle over het gebruik van middelen als alcohol en cocaïne en voedselinname.

Deze fundamenteel wetenschappelijke studie zal niet direct leiden tot een effectievere behandeling van (eet)verslaving. Verslaving, zowel aan alcohol als aan stimulerende stoffen, zoals cocaïne, en eetverslaving vormen een belangrijk maatschappelijk probleem en veroorzaken veel leed voor het verslaafde individu. Het door middel van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek verwerven van inzicht in de hersenmechanismen die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname en achterhalen of deze mechanismen, die ten grondslag liggen aan controleverlies, vergelijkbaar zijn bij middelengebruik en eetverslaving, is van groot belang. Een dergelijk kennisreservoir is onmisbaar voor toegepast en translationeel onderzoek dat voortbouwt op deze onderzoeksresultaten. Dit onderzoek kan op termijn bijdragen aan het ontwikkelen van wetenschappelijk onderbouwde interventies bij de behandeling van patiënten met (eet)verslavingsproblemen. Daarbij moet gedacht worden aan therapieën die er op gericht zijn het controleverlies over het gebruik van stimulerende middelen en voedsel op te heffen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. In bijlage 1 worden de dieren solitair gehuisvest om te voorkomen dat de ratten na de ██████████ operatie aan elkaars wonden gaan knagen. In bijlage 2 zullen de dieren solitair gehuisvest worden omdat anders de alcoholinname per rat niet bepaald kan worden, ze elkaars vena jugularis cannules kunnen beschadigen (in het geval van cocaïne experimenten) of omdat ze elkaars kapjes ██████████ ██████████) kunnen beschadigen.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker in bijlage 1 ingeschat als matig vanwege de operatie(s) en de individuele huisvesting. In bijlage 2 is het ongerief eveneens - cumulatief - ingeschat als matig (operatie(s), milde voetschokken en individuele huisvesting).

In eerste instantie had de onderzoeker aangegeven dat er in bijlage 2 geen sprake was van ontweningsverschijnselen als gevolg van het onttrekken van de alcohol en cocaïne. De DEC was echter van mening dat er wel degelijk sprake kan zijn van ongerief als gevolg van onthouding, ook al is dat misschien niet direct zichtbaar. Daarop heeft de onderzoeker in de aanvraag opgenomen dat, hoewel er op basis van voorgaande studies bij de gebruikte doseringen voor alcohol en cocaïne geen sprake is van zichtbare tekenen van ontweningsverschijnselen, niet kan worden uitgesloten dat de dieren toch licht ongerief ondervinden door onttrekking.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt onderzoek gedaan naar de hersenverbindingen die betrokken zijn bij (eet)verslaving. Vanwege de complexiteit van de hersenen en de circuits in de hersenen is het niet mogelijk om dit in proefdierlijke alternatieven te na te bootsen. In het tweede type dierproef is het gedrag van de dieren (zoekgedrag) een belangrijke uitkomstparameter. Ook dat is in vitro niet na te bootsen. Dit onderzoek kan niet in de mens worden uitgevoerd, omdat het manipuleren van specifieke neuronale circuits met invasieve methoden noodzakelijk is voor het beantwoorden van de vraagstelling. Er wordt wel intensief samengewerkt met andere onderzoekers in Nederland die onderzoek doen naar verslaving bij mensen. Het door onderzoeker uitgevoerde proefdieronderzoek sluit nauw aan bij dit onderzoek bij mensen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Door de opzet van het project worden de condities voor de experimenten nauwkeurig bepaald. Dit zorgt ervoor dat uit ieder experiment de maximale informatie verkregen kan worden, zodat er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om meer kennis te verkrijgen. Daarnaast wordt steeds gekeken hoe ver men is met het onderzoek en of de doelstellingen al zijn bereikt. Als dat het geval is, kan volstaan worden met minder dieren dan het aantal dat is aangevraagd. Het is helaas niet mogelijk om surplus dieren te gebruiken. Voor de gedragstaken in dit onderzoek is het van belang dat de dieren experimenteel naïef zijn. In dit project zal gebruik worden gemaakt van uitsluitend mannelijke dieren, omdat middelenverslaving bij mannen significant meer voorkomt dan bij vrouwen (voor eetverslaving zijn de gegevens minder duidelijk). Bovendien zijn eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en in het kader van replicatie, is het daarom van belang om nu ook weer mannen te gebruiken. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Vanwege de aard van de experimenten worden de dieren dagelijks intensief gecontroleerd door ervaren onderzoekers. Hierdoor kan de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afgestemd worden. Na de operatie zal gebruik gemaakt worden van warmtematjes. In bijlage 2 wordt gebruik gemaakt van antibiotisch cement om uitval door infecties onder de kapjes te voorkomen. Hierdoor is het niet nodig systemische antibiotica toe te dienen. Vanwege het gebruik van zeer geavanceerde methoden kan veel gedetailleerde informatie uit een dier wordt verzameld en is het mogelijk om zeer gericht in te grijpen in hersenverbindingen. Hiervoor worden, afhankelijk van het experiment, ██████████ of ██████████ ratten gebruikt. Deze ratten zijn relatief intelligent en zijn goed in staat moeilijke gedragstaken uit te voeren. Bovendien is reeds bekend dat deze ratten verslavingsachtig gedrag laten zien. Om die reden zijn deze ratten een bijzonder goed model voor het in dit projectvoorstel beschreven verslavingsonderzoek.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk inzicht verwerven in de neurale circuits die betrokken zijn bij controle(verlies) over middelengebruik en voedselinname, substantieel is.

De DEC is van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat de genoemde handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek alleen mannelijke ratten willen gebruiken. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

Als gevolg van de operatie(s) en de individuele huisvesting in bijlage 1 en de operatie(s), individuele huisvesting en milde voetschokken in bijlage 2 treedt bij alle dieren matig ongerief op. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het verwerven van inzicht in de neurale circuits die betrokken zijn bij (het verlies van) controle over het gebruik van middelen als alcohol en cocaïne en voedselinname, opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015188

**Bijlagen**

2

Datum 24-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015188. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2015  
Geplande einddatum: 31 juli 2020  
Titel project: Neurale circuits in verslaving en controle over voedselinname  
Titel niet-technische samenvatting: Hersenverbindingen die betrokken zijn bij (eet)verslaving  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utecht

Datum:

22 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015188

**Bijlagen**

2

Datum 24-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 24 juli 2015

Vervaldatum: 23 augustus 2015

Factuurnummer: 201570188

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015188	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002015188

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Op 22 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Neurale circuits in verslaving en controle over voedselinname met aanvraagnummer AVD108002015188. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 16 september 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 24 juli 2015 17:22  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** ontvangstbevestiging aanvraag dierproeven  
**Bijlagen:** aanvraag dierproeven avd108002015188.pdf; factuur avd108002015188.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/108002015188: "Neurale circuits in verslaving en controle over voedselinname".  
Het factuur zal naar [REDACTED] verstuurd.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)  
Nationaal Comité advies proefdierbeleid

-----  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
-----



[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 13 augustus 2015 13:10  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** leges voor aanvraag AVD108002015188

Geachte [REDACTED]

De leges die u verschuldigd bent voor aanvraag AVD108002015188 zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Utrecht



**Centrale Commissie Dierproeven**

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

T 0900-2800028 (10 ct /min)

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015188

**Bijlagen**  
1

Datum 17 augustus 2015  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 

Op 22 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname' met aanvraagnummer AVD108002015188. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname' starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020. De begindatum van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum op uw aanvraag in het verleden ligt.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

**Datum**  
17 augustus 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015188

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

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

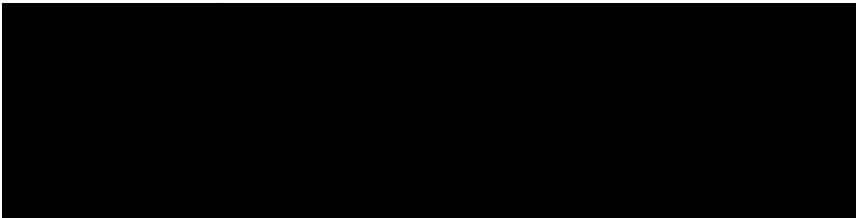
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163.

**Bijlagen**

- Vergunning
  - Hiervan deeluitmakend: - 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 woonplaats: 3501AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020, voor het project 'Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname' met aanvraagnummer AVD108002015188, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij digitale indiening op 22 juli 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 juli 2015;
  - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 juli 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht d.d. 17 juli 2015 en ontvangen op 22 juli 2015;

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Anatomie en elektrofysiologie	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	210	Matig
Optogenetische en farmacologische manipulatie van controle over cocaine, alcohol en voedselinname	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	3960	Matig

### Voorwaarde:

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

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **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

**Datum**

17 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002015188

ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 19 augustus 2015 12:27  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** besluit aanvraag AVD108002015188  
**Bijlagen:** Beschikking AVD108002015188 ondertekend.pdf; Vergunning AVD108002015188.pdf; AVD2015188\_DECadvies.pdf

Geachte [REDACTED],

Op 22 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Uw aanvraag heeft betrekking op het project "Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname" met aanvraagnummer AVD108002015188. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Zie bijgaande brief, de ondertekende beschikking is ook nog per post naar u toegezonden.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 19 augustus 2015 12:31  
**Aan:** dec-utrecht@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit aanvraag AVD108002015188

Geachte heer/mevrouw,

Op 17 juli 2015 heeft de DEC Utrecht advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Neurale circuits in verslaving en controleverlies over voedselinname' met aanvraagnummer AVD108002015188, uw kenmerk 2015.I.818.012. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

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

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.