

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015268								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



02 OKT. 2015

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK, Den Haag

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 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? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 / 168
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

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. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*
 Straat en huisnummer Geert Groteplein 10
 Postbus 9101 [Redacted]
 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] 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 | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 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 . 1 1 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 . 1 1 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechan
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische dier
- 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 [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
- DEC-advies, bijlage factuurinformatie

6 Ondertekening

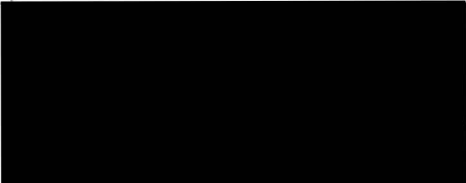
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende 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 30 - 09 - 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).
- 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. | Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models. |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input 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.

Depression is a highly burdensome psychiatric condition associated with a lifetime prevalence rate of 20%, specifically in women. Because depression affects adolescents and adults, it significantly inflicts school performance and workplace occupation, and thereby well-being and careers of the people and society as a whole. Whereas pharmacotherapies are available to treat depression, the therapies often have sub-optimal efficacy (many patients respond only partially to treatment and some fail to respond at all), leading to the presence of residual symptoms and cognitive deficits. When considering effectiveness, the sub-optimal response may be due to the limited capability of currently available antidepressants to normalize the molecular and structural alterations that are present in depressed subjects.

A number of studies support the idea that agents working through multiple mechanisms may show a superior effect on both cardinal and comorbid symptoms of depression, when compared to drugs acting on unique targets. Accordingly, combinatory treatments between antidepressants and other molecules (for example antipsychotics or mood stabilizers) have been successfully used to improve the clinical outcome, particularly in resistant patients (Millan, 2006). In this respect, novel drugs targeting receptors and transporters of monoaminergic (serotonergic, dopaminergic, noradrenergic; each of these neurotransmitters consist of one amino acid) systems (hereafter called: **multitarget monoaminergic antidepressiva**) are being developed with the idea to combine the ability to block neurotransmitter reuptake with the activity on selected monoaminergic receptors. One of these drugs is vortioxetine, which combines the inhibition of the serotonin and noradrenaline transporter with specific receptor properties, including 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT₃, and 5-HT₇ (partial) agonism. **Vortioxetine can normalize cognitive deficits as well as depressive-like behavior in different animal models (Mork et al., 2012; Jensen et al., 2013; Li et al., 2013) as well as humans (meta-analysis/clinical trials: Meeker et al., 2015; Pae et al., 2015; Berhan and Barker, 2014), although in humans superior efficacy of vortioxetine compared to mono-target antidepressants is not always found. A reason could be that individual differences in genetic make-up influence its efficacy, which are not taken into account in clinical trials. It is our hypothesis that mono-target antidepressants are most effective in those individuals exhibiting 'high mono amine expressing genotypes' and vortioxetine is most effective in those individuals exhibiting 'low mono amine expressing genotypes'. An example are those people carrying the short (s) allele of the serotonin transporter polymorphism, which leads to reduced serotonin transporter expression compared to long (l) allele carriers. Thereby, the s-allele reflects a low mono amine expressing genotype and the l-allele a high mono**

amine expressing genotype. The s-allele individuals, compared to l-allele individuals, are at increased risk for depression (Caspi et al., 2003). Simultaneously s-allele carriers, compared to l-allele carriers, respond poorly to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) (meta-analysis: Serretti et al., 2007). A plausible explanation is that 5-HTTLPR s-allele carriers exhibit a reduced transcription of the serotonin transporter gene (Heils et al., 1997), leading to reduced availability of the serotonin transporter, the target of mono-target antidepressant SSRIs. As vortioxetine is a multi-target agent it is expected to have the potency to act through other targets than the serotonin transporter and to have higher efficacy in s-allele carriers compared to SSRIs. Vice versa, l-allele carriers may specifically benefit from mono-target antidepressant, as the target is highly expressed. Polymorphisms in the enzyme encoding for tryptophan hydroxylase 2 (Tph2), the enzyme synthesizing serotonin, has also been linked to risk for depression (Gao et al., 2012), and altered responsivity to single target antidepressant treatment (Tzvetkov MV et al., 2008). If serotonin synthesis and thereby serotonin release is increased (high mono amine expressing genotype), there is more serotonin available for activation of 5-HT receptors and efficacy of SSRIs will be increased. If serotonin synthesis and thereby serotonin release is reduced (low mono amine expressing genotype), there is less serotonin available for activation of 5-HT receptors, efficacy of SSRIs will be reduced and there may be a benefit from vortioxetine treatment. **Testing the hypothesis not only benefits depressed patients carrying the 5-HTTLPR s-allele or Tph2 polymorphisms affecting Tph2 function, but also provides pharmacogenetic insights: whether the efficacy of pharmaceuticals is genotype dependent. This insight will contribute to personalized medicines.** We will test this hypothesis in rats lacking the serotonin transporter (modeling the 5-HTTLPR s-allele) and in rats lacking Tph2. Thus, the knockout (-/- and potentially +/-) animals reflect animals with 'low mono amine expressing genotypes and the wild-type animals (+/+) reflect animals with the high mono amine expressing genotypes.

One target that lying downstream from the modulation of synaptic events and that is relevant for treatment outcome is the neurotrophin BDNF, an important mediator for neuronal plasticity. In the last few years a number of studies have clearly shown that depression is associated with low BDNF levels (Polyakova et al., 2015) and that the expression, processing and trafficking of the neurotrophin BDNF in brain areas involved in mood regulation (prefrontal cortex, hippocampus) is modulated by chronic antidepressant and antipsychotic treatment (Molteni et al., 2006; Calabrese et al., 2007; Calabrese et al., 2011; Fumagalli et al., 2012; Calabrese et al., 2013; Luoni et al., 2013). Of interest, rats with a knockout of serotonin transporter not only exhibit depression-like phenotypes (Olivier et al., 2008), but also show reduced expression of specific BDNF isoforms through epigenetic mechanisms (Molteni et al., 2010). Furthermore, these alterations are corrected by chronic treatment with antipsychotics drugs which do not rely on the blockade of serotonin transporter (Calabrese et al., 2010; Guidotti et al., 2012; Luoni et al., 2013a). Tph2 knockout rats also exhibit depression-like symptoms (Lesch et al., 2012; Gutknecht et al., 2015), but BDNF levels under baseline conditions have not been measured thus far. **Taken together, we also hypothesize that vortioxetine effectively ameliorates depression-like phenotypes in serotonin transporter knockout and Tph2 rats by increasing BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex through epigenetic mechanisms.**

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?

Depression is a highly prevalent psychiatric disease and puts a high burden on society and public health service. Especially those individuals with a genetic predisposition to depression respond poorly to currently available antidepressant drugs. Using rat models for depression - carrying those genetic variants that in humans increase risk for depression and decrease responsiveness to first-line antidepressants - we aim to explore whether a new multitarget monoaminergic antidepressant drug has a better efficacy.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. How does a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, modulate neuroplasticity in genetic rat models for depression?
2. What is the impact of chronic treatment with a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, on anxious-depressive related behavior in genetic rat models for depression?

The risks of the study are low: The animal models are available, and the experimenters have experience with the proposed experiments. The antidepressant drugs have been tested for toxicology before being used in the type of in vivo experiments as proposed here.

3.3 Relevance

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

Depression mainly affects relatively young people between 25-45 years of age, the majority of them being women, and results in chronic disability and about 40% of absence from work in The Netherlands. Although many antidepressants are available, only 65% of the depressed patients respond to pharmacotherapy. This suggests that the patients who do not respond are characterized by a differential neurobiological make-up compared to those that do respond. "Vulnerability factors", such as genetic variants altering serotonergic homeostasis, like the serotonin transporter promoter polymorphism, modulate the effects of stressors on the pathogenesis of depression, as well as the efficacy of drugs. For instance, if the antidepressant drug partly acts through the serotonin transporter, and there is less serotonin transporter because of a 'low expressing' genotype, **the efficacy of the mono-amine antidepressant drugs may be less in these 'low expressing' individuals, compared to those exhibiting a 'high expressing' genotype. A better understanding of who responds best to multitarget monoaminergic antidepressant drugs (like vortioxetine) and who benefit from mono-amine antidepressant drugs, is needed for personalised treatments, leading to higher therapeutic efficacy and decreased disease burden. Thus, genotype may be used to predict who responds best to what type of antidepressant treatment, reducing trial and error in finding the most effective agent for the specific patient**

3.4 Research Strategy

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

This study aims to test the antidepressant potential of vortioxetine **versus mono-amine antidepressants, as function of genotype as well as gender**, at the level of behaviour and neuronal plasticity. In experiment 1 we decapitate rats treated with the drug or vehicle without prior testing to study the expression of genes involved in neuronal plasticity. In experiment 2 we subject the drug and vehicle treated rats to behavioural tests assessing anxiety and depression-like symptoms, followed by decapitation. In experiment 2 we can additionally investigate whether behavioural testing per se affects the expression of the genes under investigation. We use two rat serotonergic genetic models for depression, and male and female rats.

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.

Rats and drug treatment:

Adult male and female wild type (SERT+/+ (Wistar) and TPH2+/+ (Agouti)), (SERT+/- (Wistar) and TPH2+/- (Agouti)) and SERT and TPH2 knockout (SERT-/- (Wistar) and TPH2-/- (Agouti)) rats will systemically and chronically be treated (21 days) with vortioxetine (10 mg/kg) and vehicle. We include heterozygous rats, because there is debate whether it are the homozygous or heterozygous animals that best model human polymorphisms. From behavioural perspective it are the homozygous knockout animals, from a gene-dose dependent perspective it are the heterozygous animals. Separate adult wild type (SERT+/+ and TPH2+/+), heterozygous (SERT+/- and TPH2+/-) and SERT and TPH2 knockout (SERT-/- and TPH2-/-) rats will additionally be treated with the following mono-target reference drugs, in order to investigate whether vortioxetine has superior efficacy compared to mono-target antidepressants in the knockout rats, and the reference drugs have superior efficacy in wild-type rats. The reference mono-target antidepressants are:

- Fluoxetine (10 mg/kg): a selective serotonin reuptake inhibitor (Prozac; antidepressant) (Tph2 only, because SERT knockout rats miss the target for fluoxetine). **Fluoxetine is chosen because 5-HTTLR s-allele carriers respond poorly to this mono-amine antidepressant (see background)**
- Reboxetine (10 mg/kg): a selective noradrenaline reuptake inhibitor (Edronax; antidepressant) (SERT and Tph2). **Reboxetine is chosen for the following reason: If vortioxetine (targeting the serotonin and noradrenaline transporter, and 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT3, and 5-HT7 receptors) cannot exert its effects through the serotonin system in SERT and TPH2 knockout rats because it cannot evoke serotonin release in these animals, it must exert its effects through the noradrenaline transporter, which is normally expressed in SERT and Tph2 knockout rats. If this is the case, it is expected that reboxetine and vortioxetine are equally effective in SERT and TPH2 knockout rats. If SERT or TPH2 knockout are associated with compensatory changes (e.g. serotonin reuptake through the noradrenaline transporter as all mono-amine transporters also have slight affinity for other mono-amines; Suarez-Roca and Cubeddu, 2002), vortioxetine efficacy may be superior to reboxetine efficacy in the knockout animals.**

Experiments:

Group 1 will be used for the molecular analyses and they will be sacrificed 24 hours after the last injection.

Group 2 will be used for the behavioral analyses, which will include the open field (OF) test, the elevated plus maze (EPM), the Forced swim tests (FST), the ambiguous cue interpretation test (ACI) and the sucrose self-administration test, and they will be sacrificed 15 min after the FST or ACI or sucrose self-administration. This 15 min timepoint is chosen because it allows us to measure the expression of activity-dependent BDNF isoforms. The OF test is used to measure locomotor activity and anxiety, the EPM is widely accepted as test for anxiety. The FST test is the standard test for depression in rodents, measuring behavioural despair. The ACI test measures the bias towards negative stimuli. Finally, the sucrose self-

administration paradigm is used to assess anhedonia. Decapitation of rats after FST or ACI or sucrose self-administration allows us to assess stress-induced gene expression.

The choice of the depression-related tests matches diagnostic criteria for depression. Depression is diagnosed according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (fifth edition) criteria. People have to fulfill 5 of the 9 criteria. Several of these criteria can be measured in rodents, but not all (like guilt and suicidality). Since depression cannot be measured as a whole in animals, we model in rats the most important individual criteria. Using the behavioral tests for depression (sucrose consumption, ACI, FST) we tackle the criteria corresponding to: 1. Markedly diminished interest or pleasure in activities (sucrose consumption), 2. Pessimism/depressed mood (ACI), and 3. Psychomotor retardation (FST).

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 study as a whole is tailored to investigate the efficacy and working mechanism of a multi-target antidepressant in genetic rat models for depression. In experiment 1 the brain mechanisms at the level of neuronal plasticity are investigated under behavior naive conditions, and in experiment 2 these same mechanisms are investigated after exposure to anxiety- and depression-related tests. The efficacy of vortioxetine compared to mono-target antidepressants is investigated by comparing the brain and behavioural effects of vortioxetine to that of reference drugs (fluoxetine and reboxetine).

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	Decapitation
2	Behaviour

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.
- 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.	Serial number 1	Type of animal procedure Decapitation

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.

Rats will be chronically treated with vortioxetine or one of the mono-amine antidepressant drugs. The rats are decapitated without anesthesia 24 hours after the last drug injection.

Prefrontal cortex [defined as Cg1, Cg3, and IL sub-regions corresponding to the plates 6 to 10, according to the atlas of Paxinos and Watson] will be dissected from 2-mm thick slices, whereas ventral and dorsal hippocampus will be dissected from the whole brain. The brain specimens will be frozen on dry ice and stored at -80 °C for later analyses.

The outcome measures:

We will perform gene expression and protein analyses with a primary focus on the systems involved in neuronal plasticity, such as the neurotrophin BDNF.

At transcriptional levels we will analyze the mRNA levels of different BDNF transcripts as well as transcription factors that may cooperate in the regulation of neurotrophin. The real-time PCR will be used for the analysis of the gene expression. In particular we will use the TaqMan qRT-PCR instrument (CFX384 real time system, Bio-Rad Laboratories) with the iScript™ one-step RT-PCR kit for probes (Bio-Rad Laboratories). Samples will be run in 384 well formats in triplicate as multiplexed reactions with a normalizing internal standard.

The study will be implemented by the analysis of BDNF protein using specific antibody that allow to measure the mature as well as the precursor form of the neurotrophin. Thus we will have an index of both the synthesis and the processing of the neurotrophin. Moreover protein analysis will carry out in whole cell homogenate as well as in the synaptosomal fraction in order to discriminate between global changes of the neurotrophin with respect to modification occurring at synaptic level, which represent the site of neurotrophin storage and release.

The experimental groups will be as follows:

- TPH2^{+/+} or SERT^{+/+} vehicle (molecular analysis)
- TPH2^{+/+} or SERT^{+/+} vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{+/+} fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{+/+} or SERT^{+/+} reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{+/-} or SERT^{+/-} vehicle (molecular analysis)
- TPH2^{+/-} or SERT^{+/-} vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{+/-} or SERT^{+/-} reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{+/-} fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2^{-/-} or SERT^{-/-} vehicle (molecular analysis)

- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)

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

Systemic drug injections (oral gavage, i.p. or s.c.) during 21 days, once per day. The drug administration takes 5 sec-30 sec. This administration protocol is chosen because in humans antidepressant drugs typically require chronic treatment before antidepressant effects are noted. In rodents antidepressant effects are noted after approximately 2 weeks.

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

Because behaviour itself may affect gene expression, we will use separate groups of rats for antidepressant treatment effects on gene expression, and antidepressant treatment effects on behaviour, and subsequently gene expression. All proposed control groups are necessary; data cannot be appropriately interpreted without knowledge about baseline gene expression. We will not include a non-treated control group, in order to reduce the number of required animals. The comparison with no treatment and vehicle treatment is furthermore not of interest, because treatment (and any potential stress related to the treatment) is inherent to the antidepressant treatment.

Group sizes will be determined using a poweranalysis. Based on [REDACTED] we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

We use the serotonin transporter knockout (5-HTT) rat and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) knockout rats, and their wild-type controls, to model the 5-HTTLPR and TPH2 polymorphisms, resp. We use these knockout rats as genetic models for depression.

These genetic rat lines are bred by our group at [REDACTED]

Because gender differences play a role in the pathogenesis of depression (Depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014)), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that

female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a meta-analysis: Prendergast et al., 2014. Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

We use 15 rats per genotype. We have 6 genotypes (Tph2/SERT; +/+; +/-; -/-), 2 sexes, and 4 drugs (vehicle + vortioxetine + reboxetine + fluoxetine). In total we need: $15 \times 6 \times 2 \times 4 = 720$ rats.

Because SERT KO rats will not be treated with fluoxetine, the number of 720 rats will be reduced with $15 (n) \times 3$ (SERT genotypes) $\times 2$ (male/female) = 90 rats.

720-90 = 630 rats are needed

The rats will be tested during adulthood, between postnatal day 70 and 140.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat		630	P70-P120

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.

REPLACEMENT: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as neuronal plasticity and neurotrophism, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

REDUCTION: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects of the drugs under investigation on molecular mechanisms. As for the number of experimental groups present in this experiment, we will perform both protein and mRNA analyses in the same animals in order to obtain a high number of information. As depression related markers, like those investigated in the present study, are influenced by behavioural assays (e.g. Coyner J et al., 2013, Besnard A et al., 2014), we need a separate group of behavioral naïve animals to assess behavior and to perform the molecular studies. **Finally, we use a blockdesign, such that three compounds are compared to the effects of a single vehicle (saline)**

REFINEMENT: Administration of drugs is unavoidable for answering these questions effectively. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals; As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will administer the drugs and sacrifice the animals.

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

The rats receive daily drug injections. Handling helps to reduce injection stress. The injections have no adverse effects on the animal's health.

Decapitation will be done without anesthesia, because anesthesia interferes with gene expression. Because the decapitation will be done in a fraction of a second, the rats will not suffer.

Rats are socially housed and have cage 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.

n/a

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.

H. Pain and pain relief

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?

None

Explain why these effects may emerge.

All antidepressant drugs have been approved by FDA for human use and therefore no adverse well-being affecting side-effects are expected. Because the decapitation without anesthesia will be done by an experienced experimenter, and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation

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

None

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.

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

< 2%

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).

All animals (630; 6/6) will experience mild stress, including -/- rats receiving vehicle. As long as these animals are not exposure to behavioural challenges they will not experience additional suffering.

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.

We need the rats brains to assess the mechanisms by which vortioxetine and reference drugs work

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.
- 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.	Serial number 2	Type of animal procedure Behaviour

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.

Rats are chronically systemically treated with vortioxetine or mono-amine antidepressants daily for 21 days, subjected to behavioural tests of anxiety and depression, and decapitated. They are grouped as follows:

Open Field; Elevated plus maze; Forced swim test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug injection

Day 14: Open field test

Day 18: Elevated plus maze test

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug injection & day 1 of forced swim test

Day 22: Day 2 of forced swim test & decapitation

Ambiguous cue interpretation (ACI) test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 2: Start training ACI

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 22: Test day ACI & decapitation

Sucrose self-administration test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 2: Start training sucrose self-administration

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 22: Test day sucrose self-administration & decapitation

We choose for this experimental set-up, because we want the animals to have vortioxetine/fluoxetine/reboxetine drug on board when we perform the behavioural experiments. If we would perform all behavioural experiments in one group of animals, the behavioural experiments would take longer than the duration of treatment and the effects of vortioxetine/fluoxetine/reboxetine would be washed-out. Also, we cannot judge whether

any potential differences in gene expression are due to what test. Using this experimental set-up, we test the effect of forced swim stress, ACI and sucrose self-administration-related stress/reward on neurotrophin gene expression.

READ-OUTS

Open field

Rats are placed in novel open field for 1 hour and allowed to explore. Behaviour is videotaped and analysed using tracking software. We analyse distance moved and time spent in the centre

Elevated plus maze

In the elevated plus-maze, rats explore during 5 min a plus-shaped arena consisting of two sheltered "closed" arms and two brighter, unsheltered "open" arms for the duration of five minutes. Closed/open arm exploration ratio is used as a parameter for anxiety.

Porsolt test

In the Porsolt test, rats placed in a cylinder filled with water (22-24°C), on day 1 for 15 min and on day 2 for 5 min. The latency to the first float and total time of floating are used as parameters of anhedonia.

Ambiguous cue interpretation test

Rats are tested in operant boxes. A positive tone (2kHz tone) signals the opportunity to gain a reward (sweetened condensed milk) by pressing the left lever (5 daily training sessions of 30 min). A negative tone (30 s) precedes (9kHz) the occurrence of an electric foot-shock (60 s at max), which can be prevented or stopped by pressing the right lever (5 daily sessions of 30-60 min). After discrimination training (criterion: 70% correct discrimination between the negative and positive tone) rats are tested for their responses to ambiguous tones with intermediate frequencies (3, 5, and 7kHz). The rats' expectations of a positive or a negative event signalled by these tones were inferred from their lever responses (6 daily sessions of 30-60 min)(Enkel et al., 2010).

Sucrose self-administration

Rats are placed in a Skinner box or touch screen operant box and are allowed to lever press during 1 hour daily sessions for sucrose pellets. When stable responding is achieved, a progressive ratio schedule is introduced, in which the animals have to respond progressively more after each sucrose reward. This schedule has been suggested to measure anhedonia (Marchese et al., 2013). Rats are not food deprived, but the food is removed from the home cage 2 hour prior to the start of the session.

The experimental groups will be as follow:

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (molecular analysis)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

- TPH2+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)

- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/-or SERT-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/-or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

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

Systemic drug injections (oral gavage, i.p. or s.c.) during 21 days, once per day. The drug administration takes 5 sec-30 sec. This administration protocol is chosen because antidepressant drugs typically require chronic treatment before antidepressant effects are noted. Because behaviour itself may affect gene expression, we will use separate groups of rats for antidepressant treatment effects on gene expression, and antidepressant treatment effects on behaviour, and subsequently gene expression. We will not include a non-treated control group, in order to reduce the number of required animals. The comparison with no treatment and vehicle treatment is furthermore not of interest, because treatment (and any potential stress related to the treatment) is inherent to the antidepressant treatment.

Because behavioural tests may influence each other, and the risk of washout of drug effects increases the longer the tests take, we will employ three groups of rats for behavioural tests.

- 1: OF (open field; 1 hour); EPM (elevated plus maze; 5 min); FST (forced swim test; 15 min + 5 min) > 4 days in total
- 2: ACI (ambiguous cue interpretation; 2 hours per day; 3 weeks)
- 3: Sucrose self-administration; 1 hours per day; 3 weeks)

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

Data are analysed by two-way ANOVAs, using genotype and treatment as between subjects factor.

Group sizes will be determined using a poweranalysis. [REDACTED] we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

We use the serotonin transporter (5-HTT) and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) homozygous and heterozygous knockout rats, and their wild-type controls, to model the 5-HTTLPR and TPH2 polymorphisms, resp. We use these knockout rats as genetic models for depression (see background information).

Because gender differences play a role in the pathogenesis of depression, male and female rats will be used. Depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a meta-analysis: Prendergast et al., 2014). Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

We use 15 rats per genotype. We have 6 genotypes, 2 sexes, 3 sets of behavioural tests, and 6 drugs (vortioxetine/vehicle, fluoxetine/vehicle, reboxetine/vehicle). In total we need: $15 \times 6 \times 2 \times 3 \times 6 = 3240$ rats.

Because SERT KO rats will not be treated with fluoxetine, the number of 3240 rats will be reduced with $15 (n) \times 3 (SERT \text{ genotypes}) \times 2 (male/female) \times 3 (behavioural \text{ sets}) \times 2 (fluoxetine/vehicle) = 540$ rats.

3240-540 = 2700 rats are needed

The rats will be tested during adulthood, between postnatal day 70 and 140.

NB: we compare each drug to its vehicle, because in time we cannot apply all treatments simultaneously. When using a block design as for group 1 we would have to test $15 \times 3 (genotype) \times 2 (sex) \times 4 (drugs) = 360$ rats at once. Whereas it may be feasible when rats 'only' have to be injected, this will not be feasible when rats also have to be subjected to behavioural tests. It is timewise not possible to behaviourally tests so many animals on the same day (and equipment availability is also a limiting factor). If male and female rats or the three genotypes would be tested separately (scientifically not optimal, see next), we would also have too many animals for behavioural testing (180 or 120). Scientifically it is best when the drug and vehicle, the two sexes and three genotypes are tested simultaneously and not at different time points. Testing these factors at different time points is scientifically not sound, specifically because the environment at the animal facility can change (e.g. different researchers, different animal care takers, different bedding, change in food, constructions, infections, etc.). The use of a new vehicle group for each drug will pay-off when publishing the data. That is, if the experimental design is not scientifically sound, the animals have been used for nothing. With a proper scientific design we do not risk rejection of the work because of experimental design, and data acquired will - regardless of the outcome - be relevant.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat		2700	P70-P120

C. Re-use

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.

REPLACEMENT: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as neuronal plasticity and neurotrophism, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

REDUCTION: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate behavioural effects. As for the number of experimental groups present in this experiment, we will perform both protein and mRNA analyses in the same animals in order to obtain a high number of information. As depression related markers, like those investigated in the present study, are influenced by behavioural assays (e.g. Coyner J et al., 2013, Besnard A et al., 2014), we need a separate groups of behavior naïve animals to assess behavior and to perform the molecular studies.

REFINEMENT: Administration of drugs is unavoidable for answering these questions effectively. Furthermore, to measure anxiety and depression-related symptoms, the rats have to be exposed to tests employing a stressor. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals; As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will administer the drugs and sacrifice the animals.

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

The rats receive daily drug injections. Handling helps to reduce injection stress. The injections have no adverse effects on the animal's health. Decapitation will be done without anesthesia, because anesthesia interferes with gene expression. Because the decapitation will be done in a fraction of a second, the rats will not suffer.
Rats are socially housed and have cage 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.

n/a

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.

G. Location where the animals procedures are performed

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.

The rats will receive antidepressant treatment and be exposed to behavioural tests. The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers 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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Drug administration is associated with mild pain. Rats are handled very well, to minimize injection pain. The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage.

Explain why these effects may emerge.

All antidepressant drugs have been approved by FDA for human use and therefore no adverse well-being affecting side-effects are expected.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the forced swim test the rats are placed in a cylinder with water without escape possibilities. This causes substantial psychological stress. The experimenter acts within 4 seconds when the rat cannot keep its head above water. In one of the tests the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. The rats can escape the footshocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, and transgenic rats are better to do so than wild-type rats (Van der Doelen et al., 2013). In the ACI test we expect that transgenic rats bias more attention towards shock escape than to earning a reward. Finally, since rats like sucrose a lot, the sucrose self-administration paradigm is expected to be a pleasurable activity for the animals. It is expected that transgenic rats are less interested in earning sucrose.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, which contributes to stress reduction.

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.

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

< 2%

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).

All homozygous (-/-) knockout rats not receiving antidepressant treatment will experience moderate stress (1/6 of all animals)

All heterozygous (+/-) and control (+/+) animals receiving vehicle or antidepressant treatment, except for those ongoing the forced swim test, will experience mild stress (3/6 of all animals)
All rats that will be subjected to the forced swim test will experience moderate stress (2/6 of all animals)

In sum:

Half of the animals (1350) will receive moderate stress
Half of the animals (1350) will receive mild stress

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.

We need the rat brains to measure the molecular mechanisms by which antidepressant drug treatment + behaviour affects neurotrophins.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0029
2. Titel van het project: Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models
3. Titel van de NTS: Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische diermodellen voor depressie
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: 24-06-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-07-2015 tot 14-07-2015 en van 17-09-2015 tot 18-09-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 14-07-2015 en 18-09-2015
 - advies aan CCD: 28-09-2015
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: 13-07-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.1 De onderzoekers worden verzocht uit te leggen wat mono-aminerg is, of een andere omschrijving te kiezen.
 - 4.2, 4.3 en 4.4 Deze onderdelen zijn niet goed beantwoord. De onderzoekers worden verzocht deze onderdelen opnieuw in te vullen en beter aan te sluiten bij de toelichting.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A: De onderzoeker heeft veel vehicle groepen nodig. De commissie begrijpt dat het logistiek moeilijk of onmogelijk is om alle experimenten tegelijk uit te voeren (en op die manier controlegroepen uit te sparen), maar kunt u die besparing niet bereiken door een blokdesign toe te passen? Worden voor fluoxetine en reboxetine verschillende 'vehicles' gebruikt?

-DAP1. B. De onderzoekers gebruiken zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, omdat geslachtsverschillen een rol spelen. De onderzoekers worden verzocht bij onderdeel A aannemelijk te maken dat die geslachtsverschillen inderdaad een rol spelen, bijvoorbeeld door aan te geven hoe ze naar verwachting een rol spelen (mechanisme en effecten).

- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.1 Monoaminerg: er zijn 3 mono-amine neurotransmitters: dopamine, serotonine, noradrenaline. De naam mono-amine is erop gebaseerd dat deze neurotransmitters bestaan uit 1 aminozuur. Mono-aminerg betekent: dopaminerg, serotonerg of noradrenerg.

-4.2, 4.3 en 4.4 Deze onderdelen van de NTS zijn aangepast.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A: Voor de decapitatie groep hebben we nu een block design voorgesteld: 3 stoffen (vortioxetine, reboxetine en fluoxetine) worden vergeleken met een vehicle (saline). Dit is praktisch wel een behoorlijke uitdaging, omdat dit design ertoe leidt dat 15 (n) x 3 (genotype) x 4 (totaal aantal stoffen) = 180 ratten tegelijkertijd geïnjecteerd moeten worden (of 360 indien we mannelijke en vrouwelijke dieren direct met elkaar willen vergelijken). Verspreiding over tijd is wetenschappelijk niet verdedigbaar, omdat over tijd de omgeving in een dierenlab kan veranderen (wisseling onderzoekers; infectie, verbouwingen, etc.). Wanneer deze veranderingen optreden zijn er meer factoren verschillend tussen groepen dan de factoren die we willen onderzoeken. Dit blockdesign voor groep 1 (decapitatie) leidt tot een reductie van 270 dieren. Dit blockdesign kan niet toegepast worden voor groep 2 (de gedragstesten), omdat het praktisch onmogelijk is om zoveel dieren tegelijkertijd gedragsmatig te testen. Het past niet qua tijd die de gedragstesten in beslag nemen.

-DAP1. B. We hebben de volgende uitleg toegevoegd: Because depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a recent meta-analysis: Prendergast et al., 2014. Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 17-09-2015
- Strekking van de vragen:
De onderzoekers worden verzocht nog enkele kleine tekstuele wijzigingen door te voeren, beter uit te leggen wat de relevantie is van het beschreven onderzoek, en het ongerief als matig in te schalen voor de +/- transgene dieren die gedragstesten ondergaan zonder dat zij medicatie ontvangen en voor alle dieren die een zwemtest ondergaan.
- Datum antwoord: 18-09-2015
- Strekking van het antwoord:
De tekst is op de gevraagde punten aangepast.
- 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 explore whether a new multitarget monoaminergic antidepressant drug has a better efficacy'. Deze doelstelling is uitgewerkt in twee onderzoeksvragen, te weten 'how does a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, modulate neuroplasticity in genetic rat models for depression?' en 'what is the impact of chronic treatment with a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, on anxious-depressive related behavior in genetic rat models for depression?' Wetenschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de te behalen onderzoeksresultaten duidelijk zullen maken of multitarget monoaminerge antidepressiva een betere effectiviteit hebben in ratten met een genetische aanleg voor depressie vanwege uitschakeling van het SERT gen of het Tph2 gen dan monotarget monoaminerge antidepressiva. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere, wetenschappelijk onderbouwde, therapieën voor mensen met depressie waarbij de huidige therapie met monotarget monoaminerge antidepressiva onvoldoende effect heeft. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de huidige farmacotherapie bij 35% van de mensen met een

depressie niet werkt. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door genetische variatie in het serotonerge systeem. Wanneer duidelijk wordt welke mensen met een depressie beter behandeld kunnen worden met een multitarget monoaminerg antidepressivum, zou dit resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen.

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 multitarget monoaminerge antidepressiva op hersenen en gedrag van ratten met een genetische aanleg voor depressie.
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 ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gedragstesten, de genetische aanleg voor depressie en de behandeling met antidepressiva. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde dagelijkse injecties i.p. of s.c. of dagelijkse orale gavage gedurende 21 dagen, de meeste gedragstesten en het doden door decapitatie in als licht. Het ongerief als gevolg van de gedwongen zwemtest en het ongerief voor de homozygote knock-out dieren die gedragstesten ondergaan maar niet behandeld worden met antidepressiva schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 60% van de dieren en matig voor de overige 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. Het effect van farmacotherapie op hersenen of gedrag kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
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. Gedragstesten beïnvloeden de expressie van depressie-gerelateerde markers in de hersenen, waardoor de experimenten niet met minder dieren uitgevoerd kunnen worden. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 3330 ratten.
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 gekozen gedragstesten veroorzaken geen pijn bij de dieren. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
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.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het effect van

multitarget monoaminerge antidepressiva op hersenen en gedrag van ratten met een genetische aanleg voor depressie. Het is aannemelijk dat deze resultaten zullen bijdragen aan het gericht ontwikkelen van farmacotherapieën voor mensen met een depressie die vanwege genetische variatie in het serotonerge systeem geen baat hebben bij behandeling met monotarget monoaminerge antidepressiva. Het belang van meer inzicht in de werking van multitarget monoaminerge antidepressiva bij ratten en het beschikbaar komen van nieuwe, wetenschappelijk onderbouwde interventies voor een grote groep patiënten die geen baat heeft bij de gangbare behandeling acht de DEC substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60% van de dieren licht ongerief en 40% van de dieren matig ongerief zal ondervinden als gevolg van de gedragstesten, de genetische aanleg voor depressie en de beschreven handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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 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
AVD103002015268

Bijlagen

2

Datum 2 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015268. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
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: 1 november 2015
Geplande einddatum: 1 november 2020
Titel project: Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechan
Titel niet-technische samenvatting: Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische dier
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:

30 september 2015



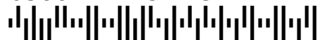
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



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
AVD103002015268

Bijlagen

2

Datum 2 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 oktober 2015

Vervaldatum: 1 november 2015

Factuurnummer: 15700268

Ordernummer: 040823-461220/2015-0029/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015268	€ 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

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
AVD103002015268

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 04 november 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' met aanvraagnummer AVD103002015268. 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 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' starten. De vergunning wordt afgegeven van 04 november 2015 tot en met 01 november 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit gevoegd d.d. 28 september 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 zijn de grondslag van dit besluit.

In aanvulling op het DEC advies hebben wij een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 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. 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: Radboud Universiteit Nijmegen
Postbus: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 04 november 2015 tot en met 01 november 2020, voor het project 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' met aanvraagnummer AVD103002015268, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair hoofddocent. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 01 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 28 september 2015, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Decapitation	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) vrouwen en mannen; SERT en Tph2 stammen; P70-P120	630	Licht
Behaviour	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) Vrouwen en mannen; SERT en Tph2 stammen; P70-P120	2700	Licht: 50% Matig: 50%

Voorwaarden

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

- 1) 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.

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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving 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

Datum

04 november 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015268

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.