

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20173165	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw			x					
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		

3165

1.



29 AUG. 2017

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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>Instantie voor dierenwelzijn</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
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>	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Groteplein 29</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101, t.a.v. CDL, [redacted]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29	Postbus	9101, t.a.v. CDL, [redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29																
Postbus	9101, t.a.v. CDL, [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.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>UHD</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[redacted]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[redacted]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[redacted]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	UHD		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	UHD																
Afdeling	[redacted]																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ 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		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ 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

Instantievoor Dierenwelzijn

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

- 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 is verleend?

☐ 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

25 . 09 . 2017

Einddatum

01 . 04 . 2020

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus

- 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 € 1.035,00 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 en 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	[Redacted]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	25 - 08 - 2017
Handtekening	[Redacted]

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.	Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☐ Translational or applied research ☐ Regulatory use of routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ 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.

Summary:

In this project we will focus for the first time on the ventral hippocampal mechanisms associated with morphine-induced associative and emotional memory. We hypothesize that morphine as a stimulus inducing emotional state could entail changes in ventral hippocampal neuroplasticity. To look into these issues, we examined how morphine-induced contextual memory affects neural activity of the ventral hippocampus. For this, long-term potentiation (LTP) as a compelling model for studying the synaptic changes in the strength of interneuronal connections will be analyzed and it will be based on the changes in amplitude and slope of excitatory post synaptic responses (EPSP). Furthermore, the effect of morphine-induced conditioned place preference on epigenetic modification of genes, DNA methylation, in the ventral hippocampus will be studied.

A small number of drugs and chemical agents can come to control human behavior by producing a state called addiction (Hyman, Malenka, & Nestler, 2006). Addiction is a complex disease process of the brain that results from recurring drug intoxication and is modulated by genetic, developmental, and environmental factors (Goldstein & Volkow, 2002). The goals of the addicted person become narrowed to obtaining, using, and recovering from drugs, despite failure in life roles, medical illness, risk of incarceration, and other problems. An important characteristic of addiction is its stubborn persistence (Hser, Hoffman, Grella, & Anglin, 2001; McLellan, Lewis, O'Brien, & Kleber, 2000). Opiates such as morphine are among the most widely consumed drug of abuse (Pouletty, 2002). Morphine currently serves as the most effective pain reliever and is frequently prescribed for moderate to

severe pain, but the clinical utility of morphine can often alter the central pain related systems and is hampered by the development of tolerance, decreased analgesic effect of the drugs, and physical and even psychological dependence, a behavioral state requiring continued dose to avoid a series of aversive withdrawal syndromes following the long-term usage of the drugs (O'Brien, 1997). Drug addiction can be understood as a pathological subversion of normal brain learning and memory processes strengthened by the motivational impact of drug associated stimuli, leading to the establishment of compulsive drug-seeking habits. Such habits evolve through a cascade of complex associative processes with Pavlovian and instrumental components that may depend on the integration and coordination of output from several somewhat independent neural systems of learning and memory, each contributing to behavioral performance (Robbins & Everitt, 2002). Recently, the molecular pathways of learning and memory on the one hand, and of drug addiction on the other, have converged. They are accompanied by alterations in neural plasticity at glutamatergic synapses (Jones, Kornblum, & Kauer, 2000; Nicola, Surmeier, & Malenka, 2000). Learning and memory are thought to be encoded by changes in the usage of interneuronal connections. In other words, synapses that experience frequent use will be strengthened, whereas those that receive less use are weakened. In this way, an experience (which results in activation of pathways and increased synaptic "use") may produce a long-lasting enhancement of communication between neurons in those pathways (resulting in a memory). Long-term potentiation (LTP) has been the most compelling model for studying the synaptic basis of use-dependent changes in the strength of interneuronal connections. In LTP, brief repetitive activation of excitatory glutamate-containing pathways (produced by high frequency stimulation, or tetanus) leads to an increase in the strength of glutamate synapses that lasts many hours in brain slices and even for weeks in intact animals (Bliss & Lømo, 1973; Fonseca, Nägerl, Morris, & Bonhoeffer, 2004). Drugs of abuse modify LTP in different areas of the mesocorticolimbic system, one of the major substrates of drugs of abuse (Everitt et al., 2008; Mameli et al., 2009). Drug-induced alterations in LTP have been proposed to be important factors leading to compulsive drug intake that they would facilitate by rendering drug taking impermeable to changes (Kauer & Malenka, 2007). LTP was first demonstrated in the hippocampus, which was part of the reason that LTP was speculated to underlie memory formation (Bliss, Collingridge, & Morris, 2003).

The hippocampus is a brain region associated with learning and memory (Everitt & Robbins, 1997). The rodent hippocampus consists of at least two distinguishable parts, dorsal and ventral, based on the neural connection with the cortex and subcortical nuclei (Maruki, Izaki, Nomura, & Yamauchi, 2001). Regional differences between the dorsal and ventral regions with respect to neurochemical and neurophysiological properties have also been reported (Izaki, Takita, & Nomura, 2000; Papatheodoropoulos & Kostopoulos, 2000). The dorsal hippocampus is particularly important for spatial memory (Moser, Moser, Forrest, Andersen, & Morris, 1995) whereas the ventral portion is involved in associative memory and emotional memory (Sahay & Hen, 2007). Emotional memory is a special category of memory involving the implicit (unconscious) learning and storage of information about the emotional significance of events (LeDoux, 1993). The conditioned place preference (CPP) animal model has been used extensively in

addiction research to study emotional memory and context-mediated drug reward and its extinction (Tzschentke, 1998). In this model, the animal learns to associate an environmental context with opiate reward. Particularly, drug administration is paired with one context, while saline administration is paired with another context. CPP develops when an animal spends more time in the chamber associated with a drug of abuse than in the chamber associated with saline (Bardo & Bevins, 2000).

The hippocampus has three well-studied synaptic pathways: first, the perforant pathway which synapses onto the granule cells in the dentate gyms; second, the granule cells which send axons (the mossy fibers) that synapse on the pyramidal cells in the CA3 region of the hippocampus; and third, the pyramidal cells in CA3 which send excitatory (Schaeffer) collaterals to the pyramidal neurons in the CA1 region of the hippocampus. Each of these three major synaptic pathways can undergo LTP, but the potentiation has different properties and perhaps a different mechanism at different sites (Brown, Kairiss, & Keenan, 1990; Zalutsky & Nicoll, 1990). In the CA1 region and the dentate gyrus, LTP has Hebbian characteristics (Brown et al., 1990), its induction requiring coincident activity in the post synaptic pyramidal neuron and presynaptic neurons. This Hebbian feature endows LTP in CA1 with a property called associativity. When weak stimulation of one input pathway (which is itself insufficient to produce LTP) is temporally paired (or associated with) strong stimulation of another input pathway (capable of producing LTP), the weak pathway also undergoes LTP. By contrast, LTP in the CA3 region is not Hebbian, and it is not associative (Chattarji, Stanton, & Sejnowski, 1989). The Hebbian characteristics of LTP in the CA1 region result from the fact that LTP only occurs if the postsynaptic cell is active (depolarized) in coincidence with the presynaptic input. Conversely, depolarization of the postsynaptic cell by intracellular current injection can induce LTP when it is paired with weak presynaptic stimulation. Maximal LTP occurs when activation of the presynaptic and postsynaptic cells is nearly simultaneous (Siegelbaum & Kandel, 1991). Accumulating evidence demonstrates that the hippocampus plays a role in opioid dependence (Rezayof, Zarrindast, Sahraei, & Haeri-Rohani, 2003). The involvement of opioids in LTP the lateral perforant path–dentate granule cell synapses has been reported (Breindl, Derrick, Rodriguez, & Martinez, 1994; Xie & Lewis, 1991). Several studies have shown that chronic exposure to morphine or heroin leads to the impairment of hippocampal LTP (Bao et al., 2007; Salmanzadeh, Fathollahi, Semnanian, & Shafizadeh, 2003) and induces cognitive deficits, as shown by poor performances on memory tasks of chronic opiate treated rodents (Gorji, Rashidy-Pour, & Fathollahi, 2008; Pu, Bao, Xu, Ma, & Pei, 2002). Furthermore, Derrick and Martinez showed the involvement of opioids in mossy fiber LTP induction. Finally, Stringer et al (Derrick & Martinez, 1994) reported that morphine had no effect on the magnitude of LTP in the CA1 region of hippocampal slices, but attenuated LTP in vivo ([Fakira et al., 2014](#); [Wen et al., 2014](#)). It was found that LTP was slightly impaired in naïve prenatal morphine exposure rats ([Tan et al., 2015](#)). In other research it was shown that acute in-vivo morphine administration induces the long-term potentiation (Mor-LTP) of field excitatory postsynaptic potentials at the prefrontal cortex-to-

nucleus accumbens shell synapses ([Zheng et al., 2014](#)). Hence, in vivo measurement of LTP is essential to understand the physiological changes underlying morphine-related emotional memories.

It is suggested that drug-induced neural plasticity drives long-term behavioral abnormalities through changes in gene expression in brain reward regions (Chao & Nestler, 2004; Nestler, 2004). However, the molecular mechanisms underlying drug-induced alterations in gene expression are still unknown. Accumulating evidence has demonstrated that epigenetic modifications, including histone acetylation and DNA methylation, play an important role in gene regulation induced by addictive drugs (Tsytyskova et al., 2007). DNA methylation occurs by transfer of a methyl group from S-adenosyl methionine (SAM), a universal methyl group donor in biochemical reactions in cells, to cytosine residues at the dinucleotide sequence CpG, and is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) (Tsankova, Renthal, Kumar, & Nestler, 2007). Recent results have indicated associations between the status of DNA methylation in the promoter region of several genes and drug addiction. For example, DNA hypermethylation in the *Oprm1* promoter region was demonstrated in lymphocytes of former methadone-maintained heroin addicts (Nielsen et al., 2009). It was found that acute and repeated cocaine treatments resulted in DNA hypermethylation and transcriptional downregulation of the protein phosphatase1 catalytic subunit (*Pp1c*) gene, and hypomethylation and transcriptional activation of *FosB* gene in the NAc (Anier, Malinovskaja, Aonurm-Helm, Zharkovsky, & Kalda, 2010). Upregulation of DNA methyltransferase 3a and 3b and global DNA hypomethylation were observed in the nucleus accumbens core (Nac) of cocaine-pretreated rats ([Wright et al., 2015](#)). Higher DNA methylation associated with chronic opioid exposure was reproduced in an independent cohort of opioid-treated as compared to non-opioid-treated pain patients. This suggests that opioids may stimulate DNA methylation ([Doehring et al., 2013](#); [Trivedi et al., 2014](#)). In opiate users, increased methylation of 2 CpG dinucleotides in the μ -opioid receptor gene (*OPRM1*) promoter region has been demonstrated ([Ebrahimi et al., 2017](#)). However, there has been no investigation so far to detect the global status of DNA methylation in the ventral hippocampus after exposure to morphine induced conditioned place preference.

Glossary for terms used throughout the application: CPP:

Conditioned Place Preference

LTP: Long Term Potentiation

SAM: S-adenosyl methionine

References:

Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2450-2461.

Bao, G., Kang, L., Li, H., Li, Y., Pu, L., Xia, P., . . . Pei, G. (2007). Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1738-1749.

- Bardo, M., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153(1), 31-43.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L., & Morris, R. G. (2003). Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 607.
- Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356.
- Breindl, A., Derrick, B. E., Rodriguez, S. B., & Martinez, J. L. (1994). Opioid receptor-dependent long-term potentiation at the lateral perforant path CA3 synapse in rat hippocampus. *Brain research bulletin*, 33(1), 17-24.
- Brown, T. H., Kairiss, E. W., & Keenan, C. L. (1990). Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Annual review of neuroscience*, 13(1), 475-511.
- Chao, J., & Nestler, E. J. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu. Rev. Med.*, 55, 113-132.
- Chattarji, S., Stanton, P. K., & Sejnowski, T. J. (1989). Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain research*, 495(1), 145-150.
- Derrick, B., & Martinez, J. (1994). Opioid receptor activation is one factor underlying the frequency dependence of mossy fiber LTP induction. *Journal of Neuroscience*, 14(7), 4359-4367.
- Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lötsch J (2013) Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. *PAIN®* 154:15-23.
- Ebrahimi G, Asadikaram G, Akbari H, Nematollahi MH, Abolhassani M, Shahabinejad G, Khodadadnejad L, Hashemi M (2017) Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter region in men with opioid use disorder. *The American journal of drug and alcohol abuse*:1-7.
- Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3125-3135.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology*, 48(1), 649-684.
- Fakira AK, Portugal GS, Carusillo B, Melyan Z, Morón JA (2014) Increased SK2 channel-mediated negative feedback on NMDAR impairs synaptic plasticity following context-dependent sensitization to morphine. *Biological psychiatry* 75:105.
- Fonseca, R., Nägerl, U. V., Morris, R. G., & Bonhoeffer, T. (2004). Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis. *Neuron*, 44(6), 1011-1020.
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 159(10), 1642-1652.
- Gorji, H. M., Rashidy-Pour, A., & Fathollahi, Y. (2008). Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze. *Physiology & behavior*, 93(3), 622-627.
- Hser, Y.-i., Hoffman, V., Grella, C. E., & Anglin, M. D. (2001). A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Archives of general psychiatry*, 58(5), 503-508.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 565-598.
- Izaki, Y., Takita, M., & Nomura, M. (2000). Comparative induction of long-term depression between dorsal and ventral hippocampal CA1 in the anesthetized rat. *Neuroscience letters*, 294(3), 171-174.
- Jones, S., Kornblum, J. L., & Kauer, J. A. (2000). Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5575-5580.
- Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews neuroscience*, 8(11), 844-858.

LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural brain research*, 58(1), 69-79.

Mameli, M., Halbout, B., Creton, C., Engblom, D., Parkitna, J. R., Spanagel, R., & Lüscher, C. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nature neuroscience*, 12(8), 1036-1041.

Maruki, K., Izaki, Y., Nomura, M., & Yamauchi, T. (2001). Differences in paired-pulse facilitation and long-term potentiation between dorsal and ventral CA1 regions in anesthetized rats. *Hippocampus*, 11(6), 655-661.

McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'Brien, C. P., & Kleber, H. D. (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama*, 284(13), 1689-1695.

Moser, M.-B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9697-9701.

Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 47, 24-32.

Nicola, S. M., Surmeier, D. J., & Malenka, R. C. (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience*, 23(1), 185-215.

Nielsen, D. A., Yuferov, V., Hamon, S., Jackson, C., Ho, A., Ott, J., & Kreek, M. J. (2009). Increased OPRM1 DNA methylation in lymphocytes of methadone-maintained former heroin addicts. *Neuropsychopharmacology*, 34(4), 867-873.

O'Brien, C. P. (1997). A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science*, 278(5335), 66-70.

Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (2000). Dorsal-ventral differentiation of short-term synaptic plasticity in rat CA1 hippocampal region. *Neuroscience letters*, 286(1), 57-60.

Pouletty, P. (2002). Drug addictions: towards socially accepted and medically treatable diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 731-736.

Pu, L., Bao, G.-B., Xu, N.-J., Ma, L., & Pei, G. (2002). Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *Journal of Neuroscience*, 22(5), 1914-1921.

Rezayof, A., Zarrindast, M.-R., Sahraei, H., & Haeri-Rohani, A. (2003). Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *Journal of psychopharmacology*, 17(4), 415-423.

Robbins, T. W., & Everitt, B. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiology of learning and memory*, 78(3), 625-636.

Sahay, A., & Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience*, 10(9), 1110-1115.

Salmanzadeh, F., Fathollahi, Y., Semnani, S., & Shafizadeh, M. (2003). Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain research*, 965(1), 108-113.

Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology*, 1(1), 113-120.

Stringer, J. L., Greenfield, L. J., Hackett, J. T., & Guyenet, P. G. (1983). Blockade of long-term potentiation by phencyclidine and σ opiates in the hippocampus in vivo and in vitro. *Brain research*, 280(1), 127-138.

Tan JW, Duan TT, Zhou QX, Ding ZY, Jing L, Cao J, Wang LP, Mao RR, Xu L (2015) Impaired contextual fear extinction and hippocampal synaptic plasticity in adult rats induced by prenatal morphine exposure. *Addiction biology* 20:652-662.

Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun H-M, Deth R (2014) Morphine Induces Redox-Based Changes in Global DNA Methylation and Retrotransposon Transcription by Inhibition of Excitatory Amino Acid Transporter Type 3-Mediated Cysteine Uptake. *Molecular pharmacology* 85:747-757.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews neuroscience*, 8(5), 355-367.

Tsytzykova, A. V., Falvo, J. V., Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Thanos, D., & Goldfeld, A. E. (2007). Post-induction, stimulus-specific regulation of tumor necrosis factor mRNA expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11629-11638.

Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in neurobiology*, 56(6), 613-672.

Wen D, Zang G, Sun D, Yu F, Mei D, Ma C, Cong B (2014) Cholecystokinin-octapeptide restored morphine-induced hippocampal long-term potentiation impairment in rats. *Neuroscience letters* 559:76-81.

Wright KN, Hollis F, Duclot F, Dossat AM, Strong CE, Francis TC, Mercer R, Feng J, Dietz DM, Lobo MK (2015) Methyl supplementation attenuates cocaine-seeking behaviors and cocaine-induced c-Fos activation in a DNA methylation-dependent manner. *Journal of Neuroscience* 35:8948-8958.

Xie, C.-W., & Lewis, D. V. (1991). Opioid-mediated facilitation of long-term potentiation at the lateral perforant path-dentate granule cell synapse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(1), 289-296.

Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 248(4963), 1619-1625.

Zheng Q, Liu Z, Wei C, Han J, Liu Y, Zhang X, Ren W (2014) Activation of the D1 receptors inhibits the long-term potentiation in vivo induced by acute morphine administration through a D1–GluN2A interaction in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 25:1191-1197.

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?

To advance the understanding of the role of the ventral hippocampus in morphine addiction and how synaptic plasticity and epigenetic modification contribute to morphine-induced emotional memories, we aim to test the hypothesis that the formation of morphine-related emotional memory is due to morphine-induced changes in neuronal plasticity and epigenetic modifications in the ventral hippocampus.

Objectives:

- In the first experiment we would like to investigate whether morphine induced CPP is associated with changes in LTP induction in the ventral hippocampus of rats.
- In the second experiment we would like to establish whether morphine induced CPP is associated with changes in global DNA methylation in the ventral hippocampus of rats.

Feasibility:

Our lab has the needed experience and facilities in-house to perform address these objectives. Our group has strong expertise in behavioral studies such as CPP (Homberg et al., 2008). I have expertise with in vivo electrophysiology, obtained at Tarbiat modares university, Tehran and Drug applied research center, Tabriz, Iran (Sadighi et al., 2013).

Reference:

Homberg, Judith R., et al. "Adaptations in pre-and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats." *Psychopharmacology* 200.3 (2008): 367-380.

Sadighi, Mina, et al. "Effect of low frequency electrical stimulation on spike and wave discharges of perioral somatosensory cortex in WAG/Rij rats." *Pathophysiology* 20.3 (2013): 171-176.

3.3 Relevance

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

According to the World Health Organization, drug addiction is ranked within the Top 10 of most burdensome disorders and costs the society 179 billion Euros annually (Olesen et al. 2012). Basic understanding of mechanisms underlying drug addiction can ultimately be back-translated into treatment adjustments in follow-up studies, and potentially prevention approaches. This is essential, because there is no satisfying pharmacotherapy available for the treatment of drug addiction. On the long-term, this research can facilitate the development of novel treatments for opiate addicts, such as the application of plasticity modifying agents.

The main goal of this research is about long lasting changes in the ventral hippocampus following morphine-associated-context memory. The findings of this project could provide novel insight into the mechanism by which morphine, and potentially other opioids, can influence on addiction-related plastic alterations and as a results drug seeking behavior and drug relapse. Since epigenetic and neural activity changes are implicated in drug addiction, this study could serve as a useful resource for investigators to explore a novel mechanism of action for other drugs of abuse.

References

Olesen, J., A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen, B. Jonsson, C. s. group and C. European Brain (2012). "The economic cost of brain disorders in Europe." *Eur J Neurol* 19(1): 155-162.

3.4 Research Strategy

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

To analyse whether emotional memory related to morphine abuse is associated with long lasting changes hippocampus, we need to study the neural activity and epigenetic changes after morphine in the brains of rats exposed to drug and CPP. To induce morphine-dependent emotional memory we use the conditioned place preference (CPP) test. In this test the emotional effects induced by the drug, in our case morphine, is associated with contextual information of the chamber in which the animals are placed immediately after a morphine injection. This is a well validated method to measure drug-related emotional memories (Prus et al., 2009). We use rats because they are the best animal model to perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals. To measure LTP in the hippocampus in freely moving animals we will stereotactically implant electrodes into the ventral hippocampus of rats. After behavioural testing we will record how neuronal activity and synaptic plasticity in the ventral hippocampus have changed. To measure epigenetic modifications associated with morphine-induced emotional memory we sacrifice the animals after CPP testing to harvest the ventral hippocampus.

Separate groups of animals are needed for the in vivo electrophysiology and ex vivo epigenetic measures, as the first requires a surgery (that could induce epigenetic changes) and perfusion in order to verify the placement of the electrode, and the latter requires freshly frozen brain tissue.

Reference:

Prus, Adam J., John R. James, and John A. Rosecrans. "Conditioned place preference." (2009).

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.

1. Experiment 1 (morphine induced conditioned place preference and electrophysiology recording)

Adult male wild type rats will undergo a stereotaxic surgery to implant electrodes in the brain. The rats will then be allowed to recover for one week. After recovery, the animals are tested in the three-compartment test cage. During the pre-test of 15 min the animals are allowed to freely explore the test cage. Then conditioning starts, during which the animals will receive subcutaneous injection of 10 mg/kg morphine immediately prior to placement in one compartment and saline in the other compartment, on alternating days. After 4 morphine and 4 saline conditioning sessions of 40 min the animals are again allowed to freely explore the test cage (post-test). The retrieval of the conditioned place memory is measured by subtracting the time the animals spent in the morphine-conditioned chamber during the pre-test from the post-test (analysed using Ethovision 3.1 software (Noldus Information Technology)). Conditioned place preference (CPP) is present if the animals spend significantly more time in the drug-paired compartment versus the vehicle-paired compartment. The ability of a stimulus, such as morphine, to produce a preference for the associated environment is generally considered to be a process driven by Pavlovian conditioning. After CPP testing, animals will be put into a cage to record hippocampus field potentials. Then animals are anesthetized and their brains are removed for histological verification of electrode placement. NB: several control groups are included: CPP testing without drug (to test whether exposure to the CPP alone has effects on plasticity), and single and repeated saline and morphine injections (to test whether it is not the drug effect itself (single or repeated), but the drug-induced emotional memory that is associated with changes in plasticity). See table below. Our unpublished data reveal substantial differences between these experimental groups (Sadighi et al., under revision at Addiction Biology), indicating that these controls are essential for the proper interpretation of the findings. The paper can be provided on request.

2. Experiment 2 (morphine induced conditioned place preference and DNA methylation study)

A new group of rats will be used. After CPP testing as mentioned above or injecting the rats with morphine and saline without CPP testing, the animals will be anesthetized and brains will be removed. Then the ventral hippocampus will be bilaterally dissected and will be prepared to measure global DNA methylation.

The animal groups in experiment 1 and 2 will be as follows:

Group	Treatment	Experiment	Role
Morphine_CPP	Morphine/saline injection for CPP	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Morphine induced CPP
Saline-CPP	saline injection for CPP (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Morphine induced CPP
CPP without injection	CPP (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	CPP
Single morphine injection	Morphine injection	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	One time drug injection effect
Single saline injection	Saline injection (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	One time vehicle injection effect
Repeated morphine injection	Morphine injection	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Repeated drug injection effect
Repeated saline injection	Saline injection (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Repeated vehicle injection effect

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

This study aims to investigate the synaptic plasticity and epigenetic modifications related to morphine addiction. This study involves two experiments, which are independent from each other: investigation of LTP (exp 1) and global DNA methylation (exp 2) in association with morphine-induced emotional memory. The experiments together address this aim. For this reason, addictive behavior of the morphine induced conditioned rats will be assessed first, followed by the measurement of either the associated neural activity or epigenetic modifications in the ventral hippocampus.

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	Behaviour

Format**Niet-technische samenvatting**

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus
1.2	Looptijd van het project	25-9-2017 - 1-4-2020
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Morfine, geheugen, synaptische plasticiteit, ventrale hippocampus, ratten

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 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Drugsverslaving gaat gepaard met veel ongerief voor patiënten en heeft grote financiële impact op de maatschappij. Methoden om drugsverslaving te behandelen zijn op dit moment nog niet goed genoeg. De reden is dat drugsverslaving nog onvoldoende wordt begrepen. Drugsverslaving is onder andere het gevolg van een te sterk geheugen voor de omgeving waar drug effecten worden ervaren. De vorming van dit geheugen hangt af van neurale plasticiteit in de hippocampus, maar de precieze mechanismen zijn nog niet opgehelderd. Wij willen in dit project deze mechanismen op helderen.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit onderzoek zal inzicht geven in de veranderingen in de aanpassingen in de hippocampus (een specifiek hersengebied) die een rol spelen bij geheugen in drugsverslaving. Geheugen voor de omgeving waar de effecten van drugs worden ervaren is een sterke drijfveer voor het in stand houden van drugsverslaving. De resultaten van ons onderzoek kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die dit geheugen kunnen afzwakken, waardoor een drugsverslaving in de toekomst mogelijk beter behandeld kan worden.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Er worden 168 ratten gebruikt
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren krijgen subcutane morfine injecties en worden in een nieuwe box gezet; deze handelingen gaan gepaard met stress. De ratten zullen ook een hersenoperatie ondergaan. Het bijkomen uit de narcose en het herstel na de operatie gaat ook gepaard met stress en ongerief.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Licht voor 50% (niet-geopereerde dieren) Matig voor 50% van de dieren
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden tijdens of na het onderzoek gedood. De hersenen van de dieren worden gebruikt om de plaatsing van de electrode te controleren of om hersenweefsel te verzamelen voor verder onderzoek.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De rat is het beste diermodel om drugsverslaving te onderzoeken. Het meeste verslavingsonderzoek is gedaan met ratten, wat vergelijkingsmateriaal oplevert voor de huidige studies. Gezien de complexiteit van het gedrag kan het onderzoek niet in minder complexe diersoorten uitgevoerd worden. We maken gebruik van de rat, en niet de mens, omdat het bestuderen van verbinding tussen hersengebieden technieken vereist die niet toepasbaar zijn bij de mens.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal aangevraagde dieren is het minimale dat nodig is voor wetenschappelijk betrouwbare uitspraken.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De dieren zijn verdoofd tijdens de operaties. Voor en na de operatie krijgen de ratten pijnstilling. Na de operatie krijgen de dieren ook een antibiotica behandeling. De dieren krijgen alternatieve kooiverrijking, waardoor beschadiging van de aangebrachte elektrode wordt voorkomen.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Om stress na de operatie te verminderen worden de dieren sociaal gehuisvest. Wanneer een dier meer ongerief heeft dan toegestaan voor dit project dan zal het op humane wijze worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	

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 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.

We will subject rats to the morphine-induced conditioned place preference (CPP) test. The primary outcome parameter is conditioned place preference (preference for drug-associated compartment during the post-test minus the pre-test)

We have the following control groups:

- Saline CPP: control for morphine CPP
- CPP without injection: control for saline CPP, testing whether exposure to the CPP itself causes changes in plasticity
- Repeated morphine injection, time matched with CPP: control for morphine CPP, testing whether plasticity changes are related to morphine-induced emotional memory and not just the rewarding effects of morphine
- Repeated saline injection, time matched with CPP: control for saline CPP and repeated morphine injection
- Single morphine injection: control for repeated morphine injection, acute morphine effect (no sensitization as may occur upon repeated drug exposure)
- Single saline injection: control for repeated saline and single morphine injection, acute injection stress effect

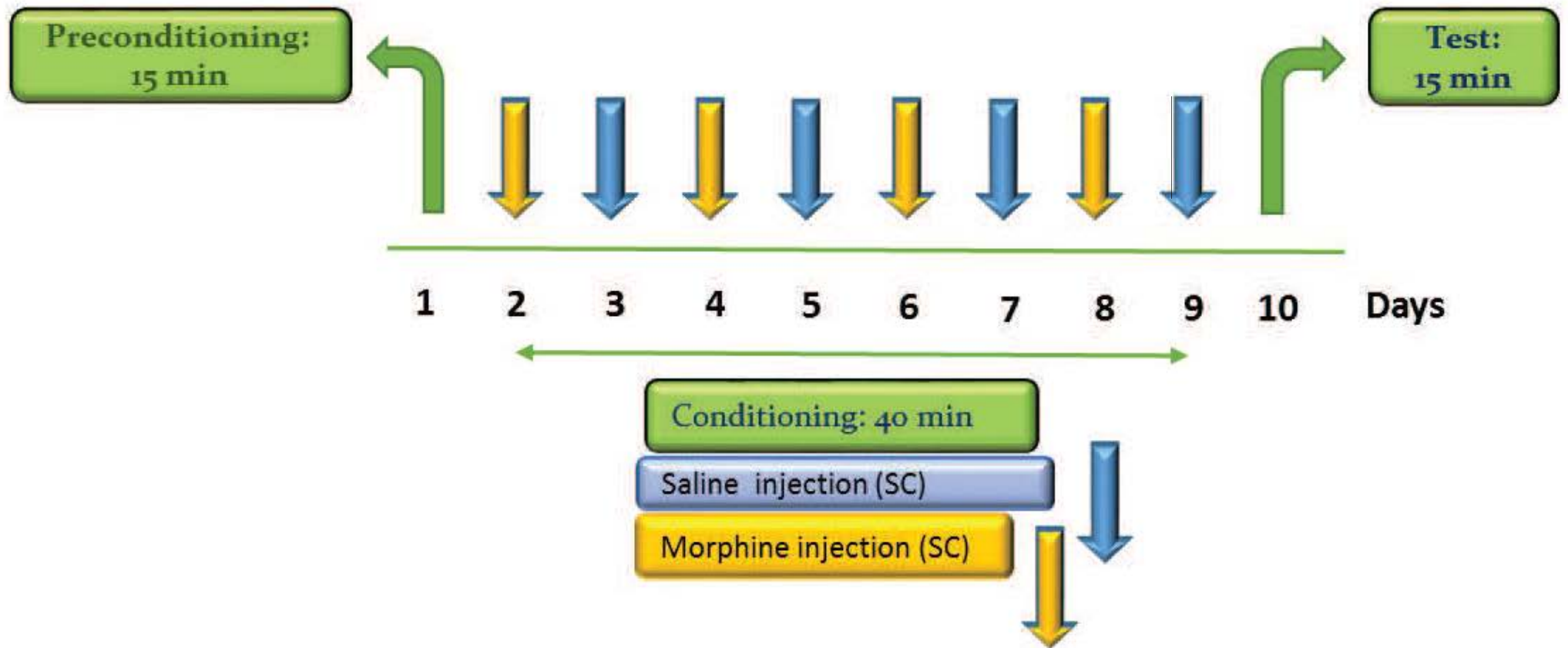
Then, the animals are divided into separate, independent two groups:

1. In vivo electrophysiology: we measure LTP induction
2. Ex vivo epigenetics: we measure global DNA methylation

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

Morphine-induced conditioned place preference (CPP): To measure morphine-induced contextual memory rats are tested in available three-compartment chambers which are visually distinctive. The CPP training consists of three different phases: preconditioning (day 1), conditioning (day 2-9) and post-conditioning (day 10). During preconditioning I determine the initial preference for either compartment. The rats are individually placed in the intermediate compartment and allowed to freely explore the whole chamber for 15 min. During conditioning (40 min/day), morphine CPP rats will be subcutaneously injected with morphine (10 mg/kg) and immediately placed in the least preferred compartment. The next day the CPP rats will be treated with saline and then be confined to the opposite compartment. This injection order will be repeated for 8 consecutive days. Rats in the saline CPP group will receive saline during all conditioning days. At the test day rats are given free access to the entire chamber for 15 min without receiving any injection. Time spent in each compartment will be measured using tracking software (Ethovision®). Time spent in the conditioning chamber during the post-test minus the pre-test defines CPP.

The CPP will be done according to the following scheme:



Day	Test	Cage compartment	Time
Day 1	Pre-test	Free access to all 3	15 min
Day 2	Morphine s.c	1	40 min
Day 3	Saline s.c	3	40 min
Day 4	Morphine s.c	1	40 min
Day 5	Saline s.c	3	40 min
Day 6	Morphine s.c	1	40 min
Day 7	Saline s.c	3	40 min
Day 8	Morphine s.c	1	40 min
Day 9	Saline s.c	3	40 min
Day 10	Post test	Free access to all 3	15 min

Experiment 1: LTP: Electrophysiological recordings:

Seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be submitted to stereotactic surgery to implant electrodes into the ventral hippocampus of the brain. Stereotactic surgery (surgery time: approximately 45-60 minutes) will be performed under isoflurane anesthesia. After anesthetizing, the head is fixed in a stereotaxic head-holder. The skull will be exposed and a concentric bipolar stimulating electrode will be placed in the ventral hippocampus to stimulate the Schaffer collateral. A recording electrode will be lowered in the ventral CA1 until the maximal response will be observed. Then the electrodes will be fixed with dental cement on the skull. After recovery and performing the CPP test, immediately after the post-test, paired pulse facilitation will be recorded 30 min before and after LTP induction (8 brief high-frequency conditioning stimulus trains (each consisting of 10 pulses at 250 Hz) at a frequency of one train per 30 s). Then animals are anesthetized and brains will be removed to do histological verification.

Experiment 2: Collecting samples and global DNA methylation analysis:

A new set of seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be used for DNA methylation study. Two hours after CPP testing (post-conditioning), the rats will be decapitated without anesthesia (anesthesia might influence epigenetic processes and gene expression). Then the ventral hippocampus will be bilaterally dissected. The changes of global DNA methylation will be examined in the ventral hippocampus. Global DNA methylation analysis: The global measurements of DNA methylation will be performed as described previously (Song et al., 2005) with some modifications. DNA will be hydrolyzed to deoxyribonucleosides and the products will be analyzed for global DNA methylation on an Agilent 1200 series rapid resolution liquid chromatography-QQQ mass spectroscopy system (Palo Alto, CA, USA).

References:

Song, Liguang, et al. "Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical chemistry* 77.2 (2005): 504-510.

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

Data will be analyzed using one-way ANOVAs. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on previous work (Homberg, 2007) we estimate group sizes at 12 per experimental group.

For experiment 1 we will use 12 rats per group. We have 7 groups including: morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, single morphine injection, single saline injection, repeated morphine injection time matched with CPP, and repeated saline injection time matched with CPP. In total we will need: $12 \times 7 = 84$ rats.

For experiment 2 we will use 12 rats per group. We have 7 groups as mentioned above. In total we will need: $12 \times 7 = 84$ rats.

Total of animals: 168 rats

Reference:

Homberg JR, De Boer SF, Raasø HS, Olivier JD, Verheul M, Ronken E, Cools AR, Ellenbroek BA, Schoffeleers AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ,

Cuppen E. Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. Psychopharmacology (Berl). 2008 Oct;200(3):367-80.

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 168.

We use male rats, because drug addiction is more prevalent in males compared to females (SAMHSA 2014, EMCDDA 2016).

References

SAMHSA (2014). "Mental Health Services Administration.(2013) Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings." Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult

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 perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. Cell-lines cannot be used because we need link neurochemical and neural activity changes to changes in behavior.

Reduction

The requested amount of animals is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. Furthermore, the same animals will be used for the behavioral paradigm and electrophysiology or epigenetic study together to obtain a high number of information, thereby leading to a minimal amount of animals needed. Lower animals cannot be used because the surgery procedures are relatively complicated leading to an unacceptable high exclusion of animals (in which the position of the electrode might be wrong) and also all rats in CPP may be not conditioned.

Refinement

The experiments will be carried out with the least discomfort possible. For this reason, cage enrichment will be applied. 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 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 discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals will be monitored daily and closely by the caretakers and scored individually for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions and weighted once a week. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals. Surgery (implanting electrode in hippocampus for electrophysiology recording) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine injection). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

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.

After surgery the animals will be housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurt the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and in the CPP test day we will do electrophysiology. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages.

G. Location where the animal 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?

H. Pain and pain relief

☐ 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.

We will handle the animals at least 3 days for 5 min before the start of an experiment. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to CPP test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the CPP test the rats will receive morphine injection (10 mg/kg). Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. Rats are singly housed, which also causes stress. Morphine injection it is not compromising health.

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

Besides standard prevention measures such as anesthesia, painkilling and cage enrich, there are no other preventive measures. All handlings are necessary for this project. Notably, while single housing causes stress, this stress is expected to be less than damage to the electrode and its skulls attachment caused by a cagemate.

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 criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one/two days is considered as humane endpoints. Also general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. Due to the surgeries and the placing of a electrodes some additional endpoints are taken into account: losing of the electrodes and weight loss of more than 15% for 3 consecutive days after the surgery. We will contact a veterinarian if there is doubt.

*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to experimental parts requiring surgeries, and the drop-out has been included in the number of animals we request

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).

Suffering	Rats	undergo	Number of animals	Experiment	
Moderate	male	1 surgery, CPP and perfusion	84	1	50%
Mild	male	CPP and decapitating	84	2	50%

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.

Experiment 1: Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for validation of the placement of the electrodes site
Experiment 2: Rats will be sacrificed by decapitation without anesthesia for molecular studies.

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: 2017-0035
2. Titel van het project: Examining the synaptic plasticity and epigenetics of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse
3. Titel van de NTS: Morfine-gerelateerd emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 20-06-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 04-07-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 10-07-2017 tot 25-07-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 24-07-2017
 - ☒ advies aan CCD: 24-08-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 10-07-2017
 - Datum antwoorden: 25-07-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

-Een looptijd van 5 jaar lijkt vrij lang voor dit onderzoek. Waarom is dit aangevraagd?

Antwoord: This happened out of habit, when starting up a new protocol in Iventionles. We have reduced the duration to 2.5 years (to anticipate planned animal facility constructions).

-Dezelfde persoon kan niet projectleider, verantwoordelijk onderzoeker en vervangend onderzoeker zijn. De commissie verzoekt de aanvrager ten minste een vervangende onderzoeker aan te wijzen.

Antwoord: Msc. Mina Sadighi will be project leader, but we cannot yet add her because her registration has to be prolonged, taking time. Will we adjust this as soon as the registration prolongation has been arranged

Project Proposal:

-3.1: De nieuwste referentie stamt uit 2010. Is er sindsdien niets meer gepubliceerd over dit onderwerp?

Antwoord: Yes, there are new references, which are listed below. We incorporated the text below in section 3.1.

New references for LTP and morphine abuse:

-Morphine has no effect on the magnitude of LTP in the CA1 region of hippocampal slices, but attenuates LTP in vivo (Fakira et al., 2014; Wen et al., 2014). It was found that LTP was slightly impaired in naïve prenatal morphine exposure rats (Tan et al., 2015). In other research it was shown that acute in-vivo morphine administration induces the long-term potentiation (Mor-LTP) of field excitatory postsynaptic potentials at the prefrontal cortex-to-nucleus accumbens shell synapses (Zheng et al., 2014).

New references for DNA methylation:

Upregulation of DNA methyltransferase 3a and 3b and global DNA hypomethylation were observed in the nucleus accumbens core (Nac) of cocaine-pretreated rats (Wright et al., 2015). Higher DNA methylation associated with chronic opioid exposure was reproduced in an independent cohort of opioid-treated as compared to non-opioid-treated pain patients. This suggests that opioids may stimulate DNA methylation (Doehring et al., 2013; Trivedi et al., 2014). In opiate users, increased methylation of 2 CpG dinucleotides in the μ -opioid receptor gene (OPRM1) promoter region has been demonstrated (Ebrahimi et al., 2017).

References:

Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lötsch J (2013) Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. PAIN® 154:15-23.
Ebrahimi G, Asadikaram G, Akbari H, Nematollahi MH, Abolhassani M, Shahabinejad G, Khodadadnejad L, Hashemi M (2017) Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter region in men with opioid use disorder. The American journal of drug and alcohol abuse:1-7.
Fakira AK, Portugal GS, Carusillo B, Melyan Z, Morón JA (2014) Increased SK2 channel-mediated negative feedback on NMDAR impairs synaptic plasticity following context-dependent sensitization to morphine. Biological psychiatry 75:105.
Tan JW, Duan TT, Zhou QX, Ding ZY, Jing L, Cao J, Wang LP, Mao RR, Xu L (2015) Impaired contextual fear extinction and hippocampal synaptic plasticity in adult rats induced by prenatal morphine exposure. Addiction biology 20:652-662.
Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun H-M, Deth R (2014) Morphine Induces Redox-Based Changes in Global DNA Methylation and Retrotransposon Transcription by Inhibition of Excitatory Amino Acid Transporter Type 3-Mediated Cysteine Uptake. Molecular pharmacology 85:747-757.
Wen D, Zang G, Sun D, Yu F, Mei D, Ma C, Cong B (2014) Cholecystokinin-octapeptide restored morphine-induced hippocampal long-term potentiation impairment in rats. Neuroscience letters 559:76-81.
Wright KN, Hollis F, Duclot F, Dossat AM, Strong CE, Francis TC, Mercer R, Feng J, Dietz DM, Lobo MK (2015) Methyl supplementation attenuates cocaine-seeking behaviors and cocaine-induced c-Fos activation in a DNA methylation-dependent manner. Journal of Neuroscience 35:8948-8958.
Zheng Q, Liu Z, Wei C, Han J, Liu Y, Zhang X, Ren W (2014) Activation of the D1 receptors inhibits the long-term potentiation in vivo induced by acute morphine administration through a D1–GluN2A interaction in the nucleus accumbens. Neuroreport 25:1191-1197.

-3.1: De achtergrondbeschrijving is erg gedetailleerd en afgestemd op vakgenoten, waardoor het lastig te volgen is voor de geïnteresseerde leek. Wat zijn de hoofdlijnen? Kan dit begrijpelijker gepresenteerd worden?

Antwoord: We added the following summary to the beginning of section 3.1: In this project we will focus for the first time on the ventral hippocampal mechanisms associated with morphine-induced associative and emotional memory. We hypothesize that morphine as a

stimulus inducing emotional state could entail changes in ventral hippocampal neuroplasticity. To look into these issues, we examined how morphine-induced contextual memory affects neural activity of the ventral hippocampus. For this, long-term potentiation (LTP) as a compelling model for studying the synaptic changes in the strength of interneuronal connections will be analyzed and it will be based on the changes in amplitude and slope of excitatory post synaptic responses (EPSP). Furthermore, the effect of morphine-induced conditioned place preference on epigenetic modification of genes, DNA methylation, in the ventral hippocampus will be studied.

-3.3: De gepresenteerde relevantie is erg algemeen gehouden. Kunnen de onderzoekers dit wat uitgebreider beschrijven en meer toespitsen op dit onderzoek?

Antwoord: We have added the following text: The main goal of this research is about long lasting changes in the ventral hippocampus following morphine-associated-context memory. The findings of this project could provide novel insight into the mechanism by which morphine, and potentially other opioids, can influence on addiction-related plastic alterations and as a result drug seeking behavior and drug relapse. Since epigenetic and neural activity changes are implicated in drug addiction, this study could serve as a useful resource for investigators to explore a novel mechanism of action for other drugs of abuse.

-3.4.3: Is experiment twee zinvol wanneer er geen LTP verschillen worden gevonden? Als zich hier een go/no go moment bevindt, dan dient dit duidelijk omschreven te worden.

Antwoord: These are two separate experiments. In experiment one we are going to investigate the effect of morphine induced CPP on neural activity and we will measure LTP. In the second experiment we will focus on gene changes as a consequence of morphine induced CPP. At the end if we could find any correlation between two experiments we can discuss more about the mechanism of neural activity changes. Findings can however be independent.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-A2: Er staat dat alle dieren een stereotactische operatie ondergaan. Dit is toch niet nodig wanneer de dieren gebruikt worden voor de DNA methyleringsstudie? Uit de beschrijving bij A1 blijkt dat de dieren in twee groepen worden verdeeld, waarbij electrofysiologie bij één deel van de dieren wordt uitgevoerd.

Antwoord: In this part we have a subtitle about LTP and electrophysiology recording. In this part we explained about animal's surgery and electrophysiology and it shows that we do surgery for LTP recording. For experiment 2 we will apply decapitation to continue with the DNA methylation study; there is no need for a surgery. So we will do stereotaxic surgery just for experiment 1 animals. We have clarified that experiment 1 and 2 are separate experiments and that no surgery is needed for experiment 2.

-F: Zullen er dieren individueel gehuisvest worden na de stereotactische operatie? Indien van toepassing hier graag vermelden, evenals de lengte van deze huisvesting en de onderbouwing van de noodzaak.

Antwoord: After surgery the animals will be housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurt the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and at the CPP test day we will perform the electrophysiological recordings. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages. We have added this to section F.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project van beperkte omvang. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken of het emotionele geheugen voor morfine verslaving geassocieerd is met door morfine veroorzaakte veranderingen in neuronale plasticiteit en epigenetische veranderingen in de ventrale hippocampus. Het uiteindelijke doel is meer inzicht te verkrijgen in mechanismen die een rol spelen bij verslaving, zodat uiteindelijk nieuwe behandelingen voor drugsverslaafden ontwikkeld kunnen worden. De onderzoekers zullen de veranderingen in plasticiteit en epigenetica van de ventrale hippocampus veroorzaakt door morfineverslaving onderzoeken. Dit geeft een indicatie van de mechanismen die mogelijk betrokken zijn bij verslaving, maar levert niet direct bruikbare handvatten voor nieuwe behandelingen. Er is daarom binnen deze aanvraag geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van drugsverslaving nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen voor drugsverslaving. Naar de mening van de DEC is het doel van

deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor de doelgroep en de samenleving is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor drugsverslaving. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan effectievere behandeling van verslaving, bijvoorbeeld omdat men de verslaafde medicamenteus of anderszins kan ondersteunen bij het staken van het gebruik van de verslavende middelen. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor (drugs)verslaving, is van groot belang voor de samenleving.

6. De onderzoekers vermelden geen onbedoelde effecten op het milieu. De DEC ziet geen redenen om aan te nemen dat die er wel zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de dieren wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de stereotactische operatie en de gedragstesten. Het cumulatieve ongerief voor de helft van de dieren wordt ingeschat als matig door de combinatie van gedragstesten en de operatie. Voor de overige dieren is het ongerief licht: zij worden niet geopereerd.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door de gevolgen van de morfinetoediening en het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met dit ratmodel ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoekers willen veranderingen in gedrag koppelen aan veranderingen in neurale activiteit en epigenetische effecten in het DNA. Dit kan niet zonder proefdieren worden onderzocht.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Op basis van poweranalyses wordt de benodigde groepsgrootte berekend.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De rat is het kleinste dier met een voldoende uitgebreid gedragsrepertoire waarin de benodigde operaties met een hoog slagingspercentage kunnen worden uitgevoerd. De dieren ontvangen adequate pijnstilling voor de handelingen waarvoor dit vereist is. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: we gebruiken mannelijke ratten omdat drugsverslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. De DEC is van mening dat de aanvrager het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. Het (ook) gebruiken van vrouwelijke dieren in dit fundamentele stadium van het onderzoek zou naar

het oordeel van de DEC bovendien slechts tot gebruik van extra dieren leiden, zonder dat dit extra informatie oplevert.

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

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van de gezondheid en kwaliteit van leven van mensen die verslaafd zijn. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Verslaving aan morfine en andere geneesmiddelen en drugs is moeilijk te behandelen. Veel ex-verslaafden raken toch weer verslaafd, mede omdat er een te sterk geheugen is voor de omgeving waar de effecten van drugs worden ervaren. De resultaten van dit project zullen meer licht werpen op het ontstaan van dit geheugen. Op lange termijn kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die dit geheugen afzwakken, waardoor een (morfine)verslaving met meer succes behandeld zou kunnen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor (morfine)verslaving van substantieel belang. Meer kennis over geheugenvorming bij verslaving is ook voor andere onderzoeksgebieden van belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken of het emotionele geheugen voor morfine verslaving geassocieerd is met door morfine veroorzaakte veranderingen in neuronale plasticiteit en epigenetische veranderingen in de ventrale hippocampus. Het uiteindelijke doel is meer inzicht te verkrijgen in mechanismen die een rol spelen bij verslaving, zodat uiteindelijk nieuwe behandelingen voor drugsverslaafden ontwikkeld kunnen worden. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de samenleving voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen

voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

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

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

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]

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
AVD1030020173165

Bijlagen

2

Datum 25 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020173165. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

25 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020173165

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
25 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 29
Postbus: 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Datum:
25 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

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: 25 september 2017
Geplande einddatum: 1 april 2020
Titel project: Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona
Titel niet-technische samenvatting: Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]

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

AVD1030020173165

Bijlagen

2

Datum 25 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 augustus 2017

Vervaldatum: 24 september 2017

Factuurnummer: 173165

Ordernummer: 040823-461220 /2017-0035 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020173165	€ 1035,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:15
Aan: 'Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD1030020173165:aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED],

Op 25 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

-U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek.

- U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.

- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de

NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo

Verzonden: vrijdag 25 augustus 2017 12:14

Aan: Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

CC: [REDACTED]

Onderwerp: OntvangstBevestiging 3165

Geachte [REDACTED],

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
 Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dear CCD committee members,

Thank you for evaluating our proposal with the number AVD1030020173165 (internal number 2017-0035). Please find below how we addressed your questions in the proposal.

Kind regards,

██████████ and ██████████

[De bijbehorende documenten (NTS en DAP) zullen via de beveiligde verbinding worden opgestuurd.
Vriendelijke groet, ██████████ PhD, Animal Welfare Body RU/Radboudumc, ██████████
██████████

Question 1:

U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek

Answer: Exposure to a drug may lead to altered regulation of hundreds of genes or more. General anesthetics were once believed to be ‘drugs without receptors’ but this view has been largely abandoned. During the past decade significant progress in understanding of the mechanisms of general anesthetic action at the molecular, cellular and neural systems levels has been made (1,2). Exposure to general anesthesia causes substantial epigenetic modulations. Epigenetic mechanisms translate environmental influences into changes in the expression of target genes (3). Enzymatic modifications (*e.g.*, acetylation, methylation, phosphorylation) of amino acids in the *N*-terminus of histones lead to dramatic changes in chromatin structure (4). Data from the literature show that general anesthesia causes H3 hypoacetylation of *N*-terminal lysines, an epigenetic change known to result in the condensed conformation of chromatin which is less conducive to transcription (5). Transcription of two target genes, *BDNF* and *c-Fos*, was indeed decreased by anesthesia, a change that occurred at least in part due to histone hypoacetylation in their promotor regions. Another study has demonstrated that brief general anesthesia produces changes in gene expression in the hippocampus of rats that last at least 2 days (7?). The affected genes participate in a wide array of processes including cell survival, signal transduction and synaptic plasticity, transcriptional regulation, metabolism, cell cycle, protein biosynthesis, and structural and vesicular processes, implying that multiple molecular processes are still altered 2 days after general anesthesia. This study showed that in anesthetized rats compared to unanesthetized controls, 297 genes were differentially expressed 2 days following anesthesia ($P < 0.05$). Of these, 64% were up-regulated and 36% were down-regulated (figure1) (7). In addition, hippocampal BDNF expression was found to be reduced in adult animals treated with isoflurane (8). It has been shown that general anesthetics also can cause substantial changes in protein expression (Table1) [9,1]. For example, even brief exposure to isoflurane leads to widespread changes in genetic control in the amygdala 6 h after exposure (10). Based on all studies mentioned above, we decided to decapitate rats without using anesthesia to prevent effect of these drugs on epigenetic modifications. Since we aim to study the epigenetic mechanisms associated with morphine-induced contextual memories, and the use of anesthetics would literally make it impossible to make those effects visible.

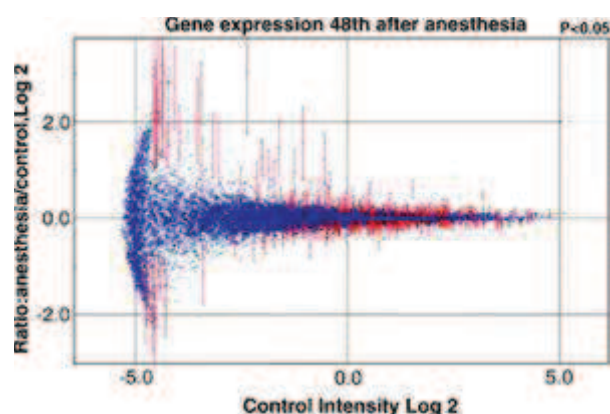


Figure 1. Scatter plot of gene expression ratios between anesthetized and control animals. Data are derived from Affymetrix gene chip analysis and are presented according to expression intensity. Differentially expressed genes $\pm$ S.D. are depicted in red (7).

Table 1A. Genes Linked to DNA and RNA Processing Whose Expression is Altered by Isoflurane Exposure

	Cell Cycle	Transcription From DNA			
	Cell Cycle, DNA Replication and Repair	Chromatin Remodeling	Basal Transcription Components	Transcription Factors and Cofactors	Maturation of RNA
Downregulated	Isg20 Mcnd4 Paxip1_pred Recc1	Hmga1 Myst2 "p66alpha Tada3l_pred Thap7_pred		"Rap80 "ZNF277 Miz1 Myt1l Rxrb Siahbp1 Trim28	Adar Cpsf3_pred "FLJ13213 Grsl1_pred Papd1_pred Raly_pred Rbm10 Zfp262_pred
Upregulated	Cdk1l_pred Cdkn2c Cdk4 Dnase2 Lztfl1_pred "Pinx1 Prim1 Recql_pred Sycp3 Unc84b_pred	Asf1a_pred "Set Th2a	Bteb1 Surb7_pred	Egr2 Klf3 Madh3 Mbnl2_pred Mnt_pred Mtf1_pred Nfkbia Tdg Vgll4_pred	Ascc3l1 Ddx49_pred Dhx9_pred Gle1l_pred Hnrpa0_pred "PNN Rnase4 Smn1 Srpk1_pred Ythdf3_pred Znf622_pred

References:

1. Rampil, Ira J., Daryn H. Moller, and Achim H. Bell. "Isoflurane modulates genomic expression in rat amygdala." *Anesthesia & Analgesia* 102.5 (2006): 1431-1438,
2. Csoka, Antonei B., and Moshe Szyf. "Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology." *Medical hypotheses* 73.5 (2009): 770-780.

3. Dalla Massara, Lorenza, et al. "General anesthesia causes epigenetic histone modulation of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor, target genes important for neuronal development in the immature rat hippocampus." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 124.6 (2016): 1311-1327.
4. Robison, AJ, Nestler, EJ Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction.. *Nat Rev Neurosci.* (2011). 12 623–37
5. Rudenko, A, Tsai, LH Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments.. *Neuropharmacology.* (2014). 80 70–82
6. Stafford, JM, Lattal, KM Is an epigenetic switch the key to persistent extinction?. *Neurobiol Learn Mem.* (2011). 96 35–40
7. Culley, Deborah J., et al. "Altered hippocampal gene expression 2 days after general anesthesia in rats." *European journal of pharmacology* 549.1 (2006): 71-78.
8. Degos, Vincent, and Pamela Flood. "Are Epigenetic Changes the Key to the Elusive Mechanism for the Long-lasting Effects of Anesthetic Drugs that Persist after Emergence?." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 124.3 (2016): 530-531.).
9. Pan JZ, Wei H, Hecker JG, Tobias JW, Eckenhoff RG, Eckenhoff MF. Rat brain DNA transcript profile of halothane and isoflurane exposure. *Pharmacogenet. Genomics* 2006;16:171–82.
10. Pan JZ, Xi J, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Inhaled anesthetics elicit regionspecific changes in protein expression in mammalian brain. *Proteomics* 2008;8:2983–92.

-Question 2:

U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.

Answer: We want to use male rats because of the following reasons:

- The rates of drug abuse are currently lower in women than in men. Adult men are 2–3 times more likely than women to have a drug abuse/dependence disorder (1).
- Morphine withdrawal signs are more marked in males than in females. Dopamine levels, a neurotransmitter which mediates several behavioral effects of opiates, were modified only in male by the morphine withdrawal syndrome (2).
- Male rats are more sensitive to the effects of morphine than female rats. A research study showed that morphine is more potent in males compared with females (3). Sex differences in morphine sensitivity are due to differences in opiate receptor density, binding and localization, as well as sex differences in the anatomy and physiology of opiate-responsive neural circuits (4,5,6).

Because males and females differ in terms of vulnerability to drug addiction and their sensitivity to morphine, we cannot mix males and females in a group. When including females, the number of rats required for the

current project would double. Moreover, the male rat data we obtained previously (Sadigi et al. *Addiction Biology*, in press) that serve as a basis for the present project would require extension to females. The costs (a substantial increase in the number of animals) do not weigh against the benefits (understanding the neurobiological mechanisms underlying morphine addiction in females, which are 2-3 times less likely to become addicted than males). Therefore, we believe it is scientifically sound to use male rats in the current project.

The arguments in the DAP text have been extended in line with the information given above.

References:

1. Becker, Jill B., and Ming Hu. "Sex differences in drug abuse. *Frontiers in neuroendocrinology* 29.1 (2008): 36-47.
2. Diaz, Silvina L., et al. Morphine withdrawal syndrome and its prevention with baclofen: Autoradiographic study of μ -opioid receptors in prepubertal male and female mice. *Synapse* 60.2 (2006): 132-140.
3. Peckham, Elizabeth M., and John R. Traynor (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316.3: 1195-1201.
4. Loyd DR, Murphy AZ (2006) Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. *J Comp Neurol* 496:723–738
5. Loyd DR, Murphy AZ (2008) Androgen and estrogen receptor localization on periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary neurons in the male and female rat. *J Chem Neuroanat* 36:216–226.
6. Loyd DR, Morgan MM, Murphy AZ (2007) Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. *Neuroscience* 147:456–468.

Question 3:

- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen

Answer: Thank you for noticing this error. We have corrected it. The title has been changed into: "Onderzoek naar de hersen mechanismen die ten grondslag liggen aan drug-gerelateerd geheugen"

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:14

Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD1030020173165:aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED],

Op 25 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

-U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek.

- U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.

- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo

Verzonden: vrijdag 25 augustus 2017 12:14

Aan: Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

CC: [REDACTED]

Onderwerp: OntvangstBevestiging 3165

Geachte [REDACTED],

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

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 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.

We will subject rats to the morphine-induced conditioned place preference (CPP) test. The primary outcome parameter is conditioned place preference (preference for drug-associated compartment during the post-test minus the pre-test)

We have the following control groups:

-Saline CPP: control for morphine CPP

-CPP without injection: control for saline CPP, testing whether exposure to the CPP itself causes changes in plasticity

-Repeated morphine injection, time matched with CPP: control for morphine CPP, testing whether plasticity changes are related to morphine-induced emotional memory and not just the rewarding effects of morphine

-Repeated saline injection, time matched with CPP: control for saline CPP and repeated morphine injection

-Single morphine injection: control for repeated morphine injection, acute morphine effect (no sensitization as may occur upon repeated drug exposure)

-Single saline injection: control for repeated saline and single morphine injection, acute injection stress effect

Then, the animals are divided into separate, independent two groups:

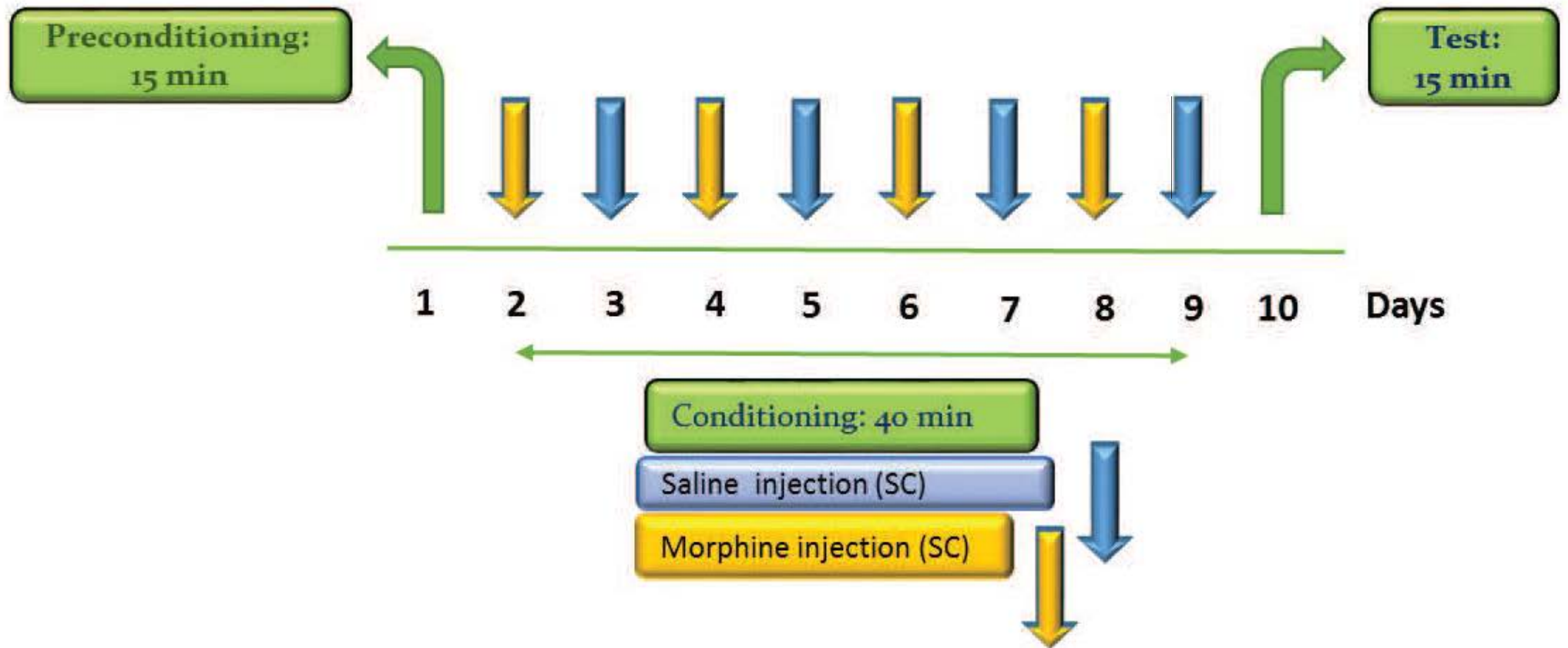
1. In vivo electrophysiology: we measure LTP induction

2. Ex vivo epigenetics: we measure global DNA methylation

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

Morphine-induced conditioned place preference (CPP): To measure morphine-induced contextual memory rats are tested in available three-compartment chambers which are visually distinctive. The CPP training consists of three different phases: preconditioning (day 1), conditioning (day 2-9) and post-conditioning (day 10). During preconditioning I determine the initial preference for either compartment. The rats are individually placed in the intermediate compartment and allowed to freely explore the whole chamber for 15 min. During conditioning (40 min/day), morphine CPP rats will be subcutaneously injected with morphine (10 mg/kg) and immediately placed in the least preferred compartment. The next day the CPP rats will be treated with saline and then be confined to the opposite compartment. This injection order will be repeated for 8 consecutive days. Rats in the saline CPP group will receive saline during all conditioning days. At the test day rats are given free access to the entire chamber for 15 min without receiving any injection. Time spent in each compartment will be measured using tracking software (Ethovision[®]). Time spent in the conditioning chamber during the post-test minus the pre-test defines CPP.

The CPP will be done according to the following scheme:



Day	Test	Cage compartment	Time
Day 1	Pre-test	Free access to all 3	15 min
Day 2	Morphine s.c	1	40 min
Day 3	Saline s.c	3	40 min
Day 4	Morphine s.c	1	40 min
Day 5	Saline s.c	3	40 min
Day 6	Morphine s.c	1	40 min
Day 7	Saline s.c	3	40 min
Day 8	Morphine s.c	1	40 min
Day 9	Saline s.c	3	40 min
Day 10	Post test	Free access to all 3	15 min

Experiment 1: LTP: Electrophysiological recordings:

Seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be submitted to stereotactic surgery to implant electrodes into the ventral hippocampus of the brain. Stereotactic surgery (surgery time: approximately 45-60 minutes) will be performed under isoflurane anesthesia. After anesthetizing, the head is fixed in a stereotaxic head-holder. The skull will be exposed and a concentric bipolar stimulating electrode will be placed in the ventral hippocampus to stimulate the schaffer collateral. A recording electrode will be lowered in the ventral CA1 until the maximal response will be observed. Then the electrodes will be fixed with dental cement on the skull. After recovery and performing the CPP test, immediately after the post-test, paired pulse facilitation will be recorded 30 min before and after LTP induction (8 brief high-frequency conditioning stimulus trains (each consisting of 10 pulses at 250 Hz) at a frequency of one train per 30 s). Then animals anesthetized and brain will be removed to do histological verification.

Experiment 2: Collecting samples and global DNA methylation analysis:

A new set of seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be used for DNA methylation study. Two hours after CPP testing (post-conditioning), the rats will be decapitated without anesthesia (anesthesia might influence epigenetic processes and gene expression). Then the ventral hippocampus will be bilaterally dissected. The changes of global DNA methylation will be examined in the ventral hippocampus. Global DNA methylation analysis: The global measurements of DNA methylation will be performed as described previously (Song et al., 2005) with some modifications. DNA will be hydrolyzed to deoxyribonucleosides and the products will be analyzed for global DNA methylation on an Agilent 1200 series rapid resolution liquid chromatography-QQQ mass spectroscopy system (Palo Alto, CA, USA).

References:

Song, Liguang, et al. "Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical chemistry* 77.2 (2005): 504-510.

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

Data will be analyzed using one-way ANOVAs. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on previous work (Homberg, 2007) we estimate group sizes at 12 per experimental group.

For experiment 1 we will use 12 rats per group. We have 7 groups including: morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, single morphine injection, single saline injection, repeated morphine injection time matched with CPP, and repeated saline injection time matched with CPP. In total we will need: $12 \times 7 = 84$ rats.

For experiment 2 we will use 12 rats per group. We have 7 groups as mentioned above. In total we will need: $12 \times 7 = 84$ rats.

Total of animals: 168 rats

Reference:

Homberg JR, De Boer SF, Raasø HS, Olivier JD, Verheul M, Ronken E, Cools AR, Ellenbroek BA, Schoffeleers AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ,

Cuppen E. Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Oct;200(3):367-80.

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 168.

We use male rats, because of the following reasons:

- The rates of drug abuse are currently lower in women than in men. Adult men are 2–3 times more likely than women to have a drug abuse/dependence disorder (1).
- Morphine withdrawal signs are more marked in males than in females. Dopamine levels, a neurotransmitter which mediates several behavioral effects of opiates, were modified only in male by the morphine withdrawal syndrome (2).
- Male rats are more sensitive to the effects of morphine than female rats. A research study showed that morphine is more potent in males compared with females (3). Sex differences in morphine sensitivity are due to differences in opiate receptor density, binding and localization, as well as sex differences in the anatomy and physiology of opiate-responsive neural circuits (4,5,6).

Because males and females differ in terms of vulnerability to drug addiction and their sensitivity to morphine, we cannot mix males and females in a group. When including females, the number of rats required for the current project would double. Moreover, the male rat data we obtained previously (Sadigi et al. *Addiction Biology*, in press) that serve as a basis for the present project would require extension to females. The costs (a substantial increase in the number of animals) do not weigh against the benefits (understanding the neurobiological mechanisms underlying morphine addiction in females, which are 2-3 times less likely to become addicted than males). Therefore, we believe it is scientifically sound to use male rats in the current project.

The arguments in the DAP text have been extended in line with the information given above.

References:

1. Becker, Jill B., and Ming Hu. "Sex differences in drug abuse. *Frontiers in neuroendocrinology* 29.1 (2008): 36-47.
2. Diaz, Silvina L., et al. Morphine withdrawal syndrome and its prevention with baclofen: Autoradiographic study of μ -opioid receptors in prepubertal male and female mice. *Synapse* 60.2 (2006): 132-140.
3. Peckham, Elizabeth M., and John R. Traynor (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316.3: 1195-1201.

4. Loyd DR, Murphy AZ (2006) Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. J Comp Neurol 496:723–738
5. Loyd DR, Murphy AZ (2008) Androgen and estrogen receptor localization on periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary neurons in the male and female rat. J Chem Neuroanat 36:216–226.
6. Loyd DR, Morgan MM, Murphy AZ (2007) Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. Neuroscience 147:456–468.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult

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 perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. Cell-lines cannot be used because we need link neurochemical and neural activity changes to changes in behavior.

Reduction

The requested amount of animals is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. Furthermore, the same animals will be used for the behavioral paradigm and electrophysiology or epigenetic study together to obtain a high number of information, thereby leading to a minimal amount of animals needed. Lower animals cannot be used because the surgery procedures are relatively complicated leading to an unacceptable high exclusion of animals (in which the position of the electrode might be wrong) and also all rats in CPP may be not conditioned.

Refinement

The experiments will be carried out with the least discomfort possible. For this reason, cage enrichment will be applied. 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 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 discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals will be monitored daily and closely by the caretakers and scored individually for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions and weighted once a week. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals.

Surgery (implanting electrode in hippocampus for electrophysiology recording) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine injection).

Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

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.

After surgery the animals will be housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurt the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and in the CPP test day we will do electrophysiology. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages.

G. Location where the animal 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?

H. Pain and pain relief

☐ 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.

We will handle the animals at least 3 days for 5 min before the start of an experiment. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to CPP test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the CPP test the rats will receive morphine injection (10 mg/kg). Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. Rats are singly housed, which also causes stress. Morphine injection it is not compromising health.

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

Besides standard prevention measures such as anesthesia, painkilling and cage enrich, there are no other preventive measures. All handlings are necessary for this project. Notably, while single housing causes stress, this stress is expected to be less than damage to the electrode and its skulls attachment caused by a cagemate.

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 criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one/two days is considered as humane endpoints. Also general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. Due to the surgeries and the placing of a electrodes some additional endpoints are taken into account: losing of the electrodes and weight loss of more than 15% for 3 consecutive days after the surgery. We will contact a veterinarian if there is doubt.

*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to experimental parts requiring surgeries, and the drop-out has been included in the number of animals we request

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).

Suffering	Rats	undergo	Number of animals	Experiment	
Moderate	male	1 surgery, CPP and perfusion	84	1	50%
Mild	male	CPP and decapitating	84	2	50%

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.

Experiment 1: Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for validation of the placement of the electrodes site
Experiment 2: Rats will be sacrificed by decapitation without anesthesia for molecular studies.

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. CDL,
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
AVD1030020173165

Bijlagen

1

Datum 28 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u vragen gesteld over het doden van de dieren, het gebruik van alleen mannelijke dieren en de NTS. Met uw antwoord heeft u een aangepaste bijlage dierproeven en een aangepaste NTS meegestuurd. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2017 tot en met 1 april 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 augustus 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

28 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020173165

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
28 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2017 tot en met 1 april 2020, voor het project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" met aanvraagnummer AVD1030020173165, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UHD. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2017, ontvangen op 25 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Behaviour				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	168	50% Matig 50% Licht	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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

Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1030020173165

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

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 zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.