

		Inventaris Wob-verzoek W17-08								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 2017872	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x	x	x	x	
4		Bijlage				x	x	x	x	
5		Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
6		Verzoek om aanvullende informatie DEC				x		x	x	
7		Verzoek om aanvullende informatie aanvrager				x		x	x	
8		Antwoord DEC				x		x	x	
9		Antwoord aanvrager				x		x	x	
10		DEC-Advies				x		x	x	
11		Advies CCD		x						x
12		Beschikking en vergunning				x		x	x	



22 FEB. 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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ 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.

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.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10
Postbus	9101, [redacted]
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	[redacted]	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[redacted]	
Afdeling	[redacted]	
Telefoonnummer	[redacted]	
E-mailadres	[redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 7 _ 0 3 _ 2 0 1 7
- Einddatum 1 7 _ 0 3 _ 2 0 2 2
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Comorbiditeit tussen depressie en cocaine verslaving: de rol van de habenula
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted]
- E-mailadres [Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 17 - 02 - 2017

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula

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 ☐ 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.

Drug addiction and depression are major psychiatric disorders associated with a tremendous burden for those who are inflicted, including families, as well as society. According to the World Health Organization, these disorders are among the Top 3 (depression) and Top 10 (drug addiction) of most burdensome disorders and cost the society 179 billion Euros (Olesen et al. 2012). A hallmark of drug addiction is compulsive drug intake as an attempt to increase the brain's reward's levels, while depression is characterized by a negative mood and a low reward state. Intriguingly, the two psychiatric conditions are highly comorbid. 35-50% (Conner et al. 2008, Leventhal et al. 2008, Reissner et al. 2012) of all drug addicts are also depressed, but nobody knows why. Are drugs used to decrease depressive feelings, or do drugs trigger a negative emotional state? An alternative thought is that the intensity, rather than the value, of stimuli matters. That is, if emotions are flat, neither depression nor drug addiction may occur. As depressed patients are highly sensitive to stressors and drug addicts are highly sensitive to drugs of abuse, the two seemingly 'opposing' psychiatric conditions may share a common neural substrate. Since responsivity to environmental stimuli, being of negative or positive value, is essential for survival of a species (e.g. escaping from threat and obtaining food, resp.) it is likely that an ancient part of the brain is implicated in signaling the intensity of stimuli. One intriguing candidate is the habenula. The habenula is a small nucleus located beneath the hippocampus, and receives input from the septum, striatum, thalamus and pallium (see figure 1).

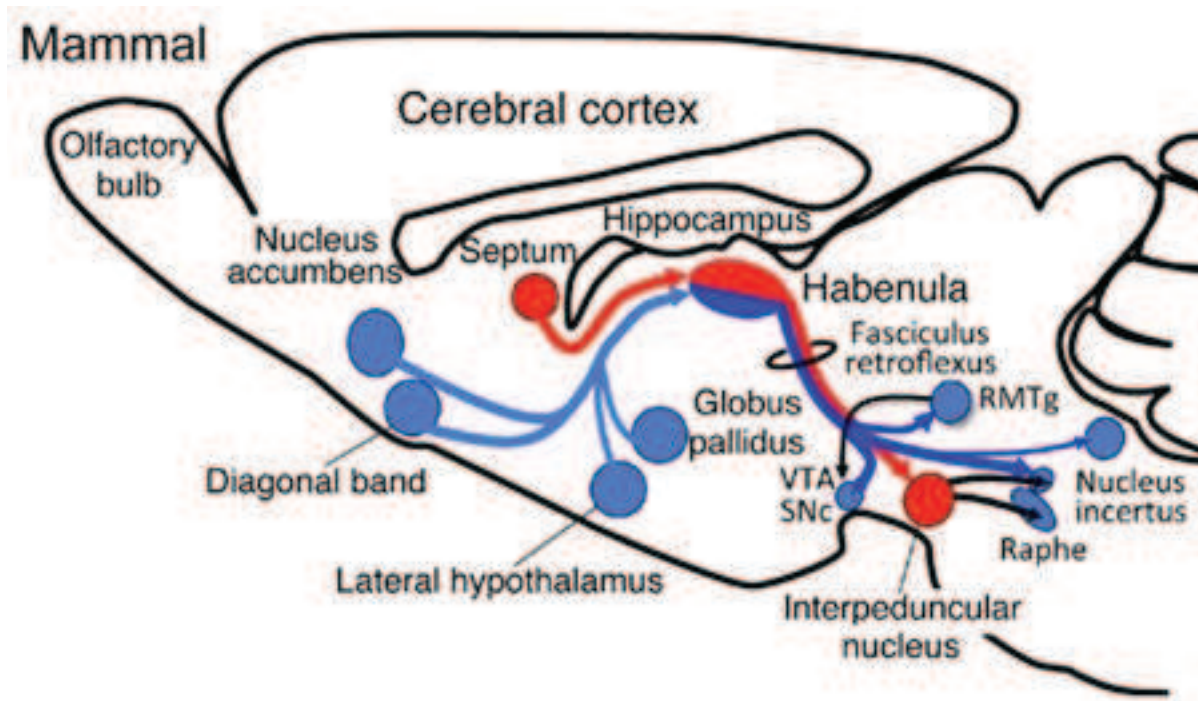


Figure 1. The position of the habenula in the rodent brain

The habenula can be divided into two parts: the lateral habenula (LHb) and the medial habenula (MHb). The subregions differ functionally through distinctive outputs. Specifically, the lateral habenula (LHb) sends glutamatergic projection neurons to the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) region, which consists of inhibitory GABAergic neurons (Ren et al. 2011). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) on its turn projects to the ventral tegmental area (VTA), where dopaminergic neurons are located (signaling reward prediction errors), and medial/dorsal Raphe nuclei (MRN/DRN), where serotonergic neurons (predicting punishment) are located. Lateral habenula (LHb) mediated activation of inhibitory neurons in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) leads to inhibition of the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. The lateral habenula (LHb) also projects directly to the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. The Medial habenula (MHb) projects by glutamatergic afferents to the interpeduncular nucleus (IPN) (Viswanath et al. 2013). The interpeduncular nucleus (IPN) sends its GABAergic inhibitory projection to the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. These lateral habenula (LHb) and medial habenula (MHb) efferents run through the fasciculus retroflexus (see figure 1 and 2). Hence, the habenula can simultaneously inhibit and stimulate dopamine and serotonin signaling, and thereby regulate the intensity of the stimuli, regardless whether they signal reward or punishment.

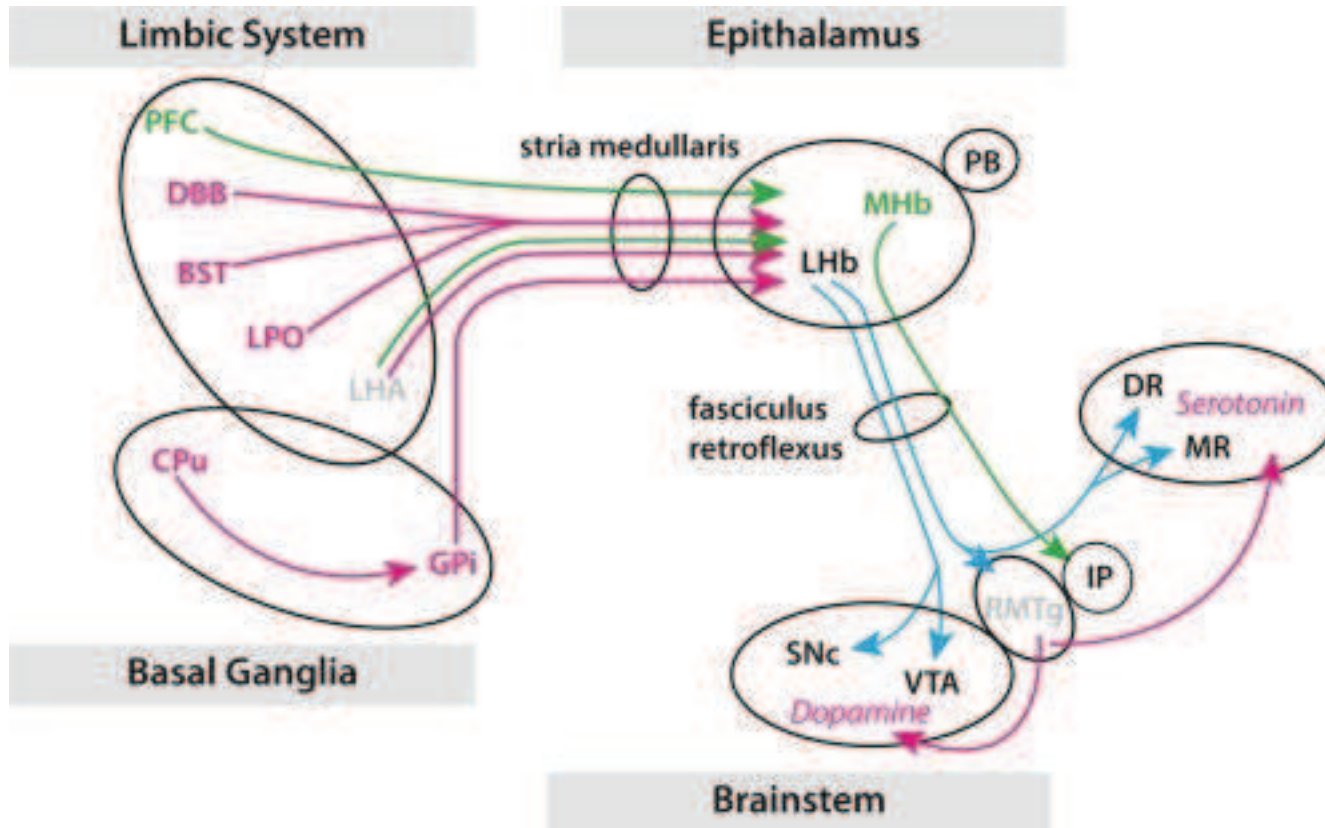


Figure 2. Habenula anatomical connections

In a delay reward discounting task, it was found that disruption of lateral habenula (LHb) signal outflow rendered animals indifferent to both the larger/uncertain reward and the smaller/certain reward. The animals responded for both options at random (Orsini et al. 2015). This observation suggests that the lateral habenula (LHb) signals the intensity of sensory stimuli per se, being either positive or negative, and thereby mediates decision making processes. Without stimulus perception, decision making is disrupted.

Drugs of abuse disturb the activity of the lateral habenula (LHb). Cocaine exposure and cocaine-related cues increase c-Fos expression in the lateral habenula (LHb), implying that the drug and drug predicting cues increase lateral habenula (LHb) activity (Brown et al. 2010, James et al. 2011, Mahler et al. 2012). In mouse lateral habenula (LHb) neurons targeting the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), cocaine enhanced glutamatergic transmission (Meye et al. 2015). Preventing this mechanism also prevented depressive-like symptoms during withdrawal from repeated cocaine administration (Meye et al. 2015). If signals coming out of the lateral habenula (LHb) are toxically amplified after cocaine exposure, ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons and raphe serotonin neurons receive a greater amount of toxic inhibition from the rostromedial tegmental

nucleus (RMTg), causing less dopamine and potentially also less serotonin to be released in reward-related and emotion-related regions, leading to a reduction of positive and negative affect. On the long-term, when drugs are used for a substantial period of time, the increased excitability of lateral habenula (LHb) glutamatergic efferents may lead to dysfunction of the fasciculus retroflexus. It has been reported that drug addicts and rats with a history of cocaine self-administration are characterized by degeneration of the fasciculus retroflexus (Lipton et al. 1991, Ellison 2002, Lax et al. 2013). In rats this was reflected by a decreased number of lateral habenula (LHb) neurons labeled with a retrograde tracer injected into the ventral tegmental area (VTA) (Lax et al. 2013).

Regarding negative affect, it was found that learned helplessness in rats, a behavioral phenotype of depression, was associated with increased metabolic activity in the lateral habenula (LHb) (Shumake et al. 2003). Stamatakis and Stuber (Stamatakis et al. 2012) found that footshock exposure, used to induce depressive-like phenotypes in rodents, enhances activity of lateral habenula (LHb) neurons projecting to the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). Additionally, activating these projections induced passive avoidance and conditioned place aversion. Vice versa, inhibition of the lateral habenula (LHb) using the DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) technology led to an anti-depressive state in the forced swim test (Nair et al. 2013). Likewise, Yang and colleagues (Yang et al. 2008) found that rats with electrolytic lesions of the lateral habenula (LHb) demonstrated a decrease in immobility time and an increase in climbing time in the forced swim test, indicative for decreased depressive-like behavior. The findings of the drug addiction and depression studies combined suggest that reward and depressive mood are mediated through comparable neural mechanisms.

The findings above seem to provide the coherent view that drugs of abuse and stressors activate the lateral habenula (LHb) and thereby decrease the activity of ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons and potentially Raphe serotonin leading to reward craving (to compensate a reward deficit) and a negative emotional state (due to a reward deficit and/or increased sensitivity to punishment). However, not all individuals using drugs or exposed to stress unequivocally develop drug addiction and depression. There are large individual differences in vulnerability to these brain disorders. Vulnerability to drug addiction and depression is, at least in part, mediated by genotype. There is ample evidence that the low activity short allelic variant of the serotonin transporter polymorphism in humans (5-HTTLPR s-allele) increases risk for depression (Karg et al. 2011) and drug addiction (Gerra et al. 2007, Martín-Santos et al. 2010, Enoch 2011). Rats lacking the serotonin transporter (5-HTT), which mimic the 5-HTTLPR s-allele (Caspi et al. 2010), show both heightened depressive-like symptoms ([REDACTED] and increased regular (not addictive) and compulsive ('addictive') cocaine self-administration [REDACTED] see figure 3). Hence, inherited 5-HTT down-regulation increases vulnerability to both drug addiction and depression, implying that the 5-HTT influences stimulus intensity. This is confirmed by research reports, meta-analyses and narrative reviews showing that 5-HTT gene variance in humans is associated with sensitivity to both aversive and rewarding stimuli (Belsky et al. 2009, Beevers et al. 2010, Mitchell et al. 2011, van Ijzendoorn et al. 2012). Since the serotonin system is the most ancient among all neurotransmitters and plays a key role in neurodevelopment (Gaspar et al. 2003, Homberg et al. 2010, [REDACTED]), it likely affects the wiring of the habenula. [REDACTED]



Figure 3. [Redacted text]



Figure 4.

Glossary for terms used throughout the application:

5-HTT: serotonin transporter
5-HTT-/-: knockout for the serotonin transporter
CAMKII: marker of glutamatergic neurons
Cre: recombinase enzyme
DRN: dorsal raphe nucleus
DREADD: Designer Receptor exclusively activated by designer drugs.
GAD67: marker of GABAergic neurons
Vglut 1-3: vesicular glutamate transporter, marks glutamatergic neurons
TpH2: Tryptophan hydroxylase 2, marks serotonergic neurons
TH: Tyrosine hydroxylase, marks dopaminergic neurons
c-fos: immediate early gene.
 Δ FosB: critical factor in the development of drug addictions.
5-HT: Serotonin
hM3Dq and hM4Di: DREADD receptors
IP: interpeduncular nucleus
LHb: lateral habenula
MHb: medial habenula
MRN: median raphe nucleus
RMTg: rostromedial tegmental nucleus
VTA: ventral tegmental area
ShA: short access, 1 hr cocaine self-administration per day
LgA: long access, 6 hrs cocaine self-administration sessions per day

References

Beevers, C. G., J. Pacheco, P. Clasen, J. E. McGeary and D. Schnyer (2010). "Prefrontal morphology, 5-HTTLPR polymorphism and biased attention for emotional stimuli." Genes, Brain and Behavior 9(2): 224-233.

Belsky, J., C. Jonassaint, M. Pluess, M. Stanton, B. Brummett and R. Williams (2009). "Vulnerability genes or plasticity genes?" Molecular psychiatry 14(8): 746-754.

Brown, R. M., J. L. Short and A. J. Lawrence (2010). "Identification of brain nuclei implicated in cocaine-primed reinstatement of conditioned place preference: a behaviour dissociable from sensitization." PLoS One 5(12): e15889.

Caspi, A., A. R. Hariri, A. Holmes, R. Uher and T. E. Moffitt (2010). "Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits." FOCUS 8(3): 398-416.

Conner, K. R., M. Pinquart and A. P. Holbrook (2008). "Meta-analysis of depression and substance use and impairment among cocaine users." Drug and Alcohol Dependence 98(1-2): 13-23.

Ellison, G. (2002). "Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry." European neuropsychopharmacology 12(4): 287-297.

Enoch, M.-A. (2011). "The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence." Psychopharmacology 214(1): 17-31.

Gaspar, P., O. Cases and L. Maroteaux (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci 4(12): 1002-1012.

Gerra, G., A. Zaimovic, L. Garofano, F. Ciusa, G. Moi, P. Avanzini, E. Talarico, F. Gardini, F. Brambilla, M. Manfredini and C. Donnini (2007). "Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(1): 52-57.

[REDACTED]

James, M. H., J. L. Charnley, J. R. Flynn, D. W. Smith and C. V. Dayas (2011). "Propensity to 'relapse' following exposure to cocaine cues is associated with the recruitment of specific thalamic and epithalamic nuclei." Neuroscience 199: 235-242.

Karg, K., M. Burmeister, K. Shedden and S. Sen (2011). "The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: Evidence of genetic moderation." Archives of General Psychiatry 68(5): 444-454.

Lax, E., A. Friedman, O. Croitoru, E. Sudai, H. Ben-Moshe, L. Redlus, E. Sasson, T. Blumenfeld-Katzir, Y. Assaf and G. Yadid (2013). "Neurodegeneration of lateral habenula efferent fibers after intermittent cocaine administration: implications for deep brain stimulation." Neuropharmacology 75: 246-254.

Leventhal, A. M., C. F. Witt and M. Zimmerman (2008). "Associations between depression subtypes and substance use disorders." Psychiatry Research 161(1): 43-50.

Lipton, J., S. Zeigler, J. Wilkins and G. Ellison (1991). "A silicone pellet for continuous cocaine: comparison with continuous amphetamine." Pharmacology Biochemistry and Behavior 38(4): 927-930.

Mahler, S. V. and G. S. Aston-Jones (2012). "Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats." The Journal of Neuroscience 32(38): 13309-13325.

Martín-Santos, R., M. Torrens, S. Poudevida, K. Langohr, E. Cuyás, R. Pacifici, M. Farré, S. Pichini and R. De La Torre (2010). "GENETIC STUDY: 5-HTTLPR polymorphism, mood disorders and MDMA use in a 3-year follow-up study." Addiction Biology 15(1): 15-22.

Meye, F. J., K. Valentinova, S. Lecca, L. Marion-Poll, M. J. Maroteaux, S. Musardo, I. Moutkine, F. Gardoni, R. L. Huganir, F. Georges and M. Mameli (2015). "Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula." Nat Neurosci 18(3): 376-378.

Mitchell, C., D. Notterman, J. Brooks-Gunn, J. Hobcraft, I. Garfinkel, K. Jaeger, I. Kotenko and S. McLanahan (2011). "Role of mother's genes and environment in postpartum depression." Proc Natl Acad Sci U S A 108(20): 8189-8193.

Nair, S. G., N. S. Strand and J. F. Neumaier (2013). "DREADDing the lateral habenula: a review of methodological approaches for studying lateral habenula function." Brain Res 1511: 93-101.

[REDACTED]

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.

[REDACTED]
Neuroscience 152(3): 573-584.

Orsini, C. A., D. E. Moorman, J. W. Young, B. Setlow and S. B. Floresco (2015). "Neural mechanisms regulating different forms of risk-related decision-making: Insights from animal models." Neurosci Biobehav Rev 58: 147-167.

Reissner, V., A. Kokkevi, F. Schifano, R. Room, J. Storbjork, R. Stohler, L. DiFuria, J. Rehm, M. Geyer, F. Holscher and N. Scherbaum (2012). "Differences in drug consumption, comorbidity and health service use of opioid addicts across six European urban regions (TREAT-project)." European Psychiatry 27(6): 455-462.

Ren, J., C. Qin, F. Hu, J. Tan, L. Qiu, S. Zhao, G. Feng and M. Luo (2011). "Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes." Neuron 69(3): 445-452.

Shumake, J., E. Edwards and F. Gonzalez-Lima (2003). "Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior." Brain Res 963(1-2): 274-281.

Stamatakis, A. M. and G. D. Stuber (2012). "Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance." Nature neuroscience 15(8): 1105-1107.

van Ijzendoorn, M. H., J. Belsky and M. J. Bakermans-Kranenburg (2012). "Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies." Transl Psychiatry 2: e147.

Viswanath, H., A. Q. Carter, P. R. Baldwin, D. L. Molfese and R. Salas (2013). "The medial habenula: still neglected." Front Hum Neurosci 7: 931.

[REDACTED]
Yang, L. M., B. Hu, Y. H. Xia, B. L. Zhang and H. Zhao (2008). "Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus." Behav Brain Res 188(1): 84-90.

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 lateral habenula (LHb) in the comorbidity between drug addiction and depression, we aim to test the hypothesis that the comorbidity between drug addiction and depression is mediated by 5-HTT genotype-dependent enhanced lateral habenula (LHb) activity, leading to increased ventral tegmental area (VTA) inhibition and a strong reward deficit, and potentially also increased Raphe inhibition and increased punishment sensitivity.

Objectives:

To define the activity, neuronal profile and connectivity of the neurocircuitry involving the lateral habenula (LHb), rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei under depressive-like conditions and during regular and compulsive cocaine self-administration, as function of serotonin transporter genotype.

Our lab has the needed experience and facilities in-house to perform these studies. Our group is expert in behavioral studies of knock-out animals and expert in depression-like measures and cocaine self-administration. [REDACTED]

[REDACTED] We also have experience with ex vivo immunohistochemistry. The measurement of neural connectivity and its manipulation is new to us. Yet, we do master the basis of the techniques, such as stereotactic surgeries and intracerebral infusion of drugs/viral vectors. The challenge involves the choice for the proper viral vectors and their injection in the appropriate brain region. [REDACTED]

[REDACTED] In sum, our experience with behavioral and histochemical measurements in rats, together with the availability of the required equipment and the expertise of how to apply these, as well as a network of colleagues with relevant expertise, provides high feasibility of this project.

3.3 Relevance

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

According to the World Health Organization, depression disorder is among the Top 3 and drug addiction is Top 10 of most burdensome disorders and cost the society 179 billion Euros (Olesen et al. 2012). The two psychiatric conditions are highly comorbid. 35-50% (Conner et al. 2008, Leventhal et al. 2008, Reissner et al. 2012) of all drug addicts are also depressed, but nobody knows why. Basic understanding of the involvement of serotonin transporter in the comorbidity of depression and drug addiction can ultimately be back-translated into treatment adjustments in follow-up studies, and potentially prevention approaches, in a personalized manner. This is essential, because besides that there is no pharmacotherapy available for the treatment of cocaine addiction, comorbidity in drug addiction is even more difficult to treat. On the long-term, this research can facilitate the development of novel treatments for patients with depression-addiction comorbidity, such as deep brain stimulation targeting the habenula.

References

Conner, K. R., M. Piquart and A. P. Holbrook (2008). "Meta-analysis of depression and substance use and impairment among cocaine users." Drug and Alcohol Dependence 98(1-2): 13-23.

Leventhal, A. M., C. F. Witt and M. Zimmerman (2008). "Associations between depression subtypes and substance use disorders." Psychiatry Research 161(1): 43-50.

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.

Reissner, V., A. Kokkevi, F. Schifano, R. Room, J. Storbjork, R. Stohler, L. DiFuria, J. Rehm, M. Geyer, F. Holscher and N. Scherbaum (2012). "Differences in drug consumption, comorbidity and health service use of opioid addicts across six European urban regions (TREAT-project)." European Psychiatry 27(6): 455-462.

3.4 Research Strategy

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

The overall aim of this research project is to elucidate the activity and neuronal profile of the neurocircuitry involving the LHb under depressive-like conditions and during regular and compulsive cocaine self-administration, as function of serotonin transporter genotype.

We employ two drug self-administration regimes: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration. The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration. For this reason, we have designed the following experiments.

Pilot study: For the experiment 1a below rats have to be equipped with an intravenous catheter and for experiment 1d the animals additionally will undergo a stereotactic surgery. These two surgeries need to be trained; specifically the finding of the proper coordinates for infusing tracers into the rostral tegmental area, VTA or raphe nuclei is challenging. The pilot study serves these two purposes.

1. Experiment 1a. Depressive-like behavior and cocaine self-administration in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. First we study depression-like behaviour (ambiguous cue interpretation test) preceding cocaine self-administration, and then during withdrawal from regular and compulsive cocaine self-administration. To assess regular and compulsive self-administration we use the short access and long access cocaine self-administration regimes, respectively. See figure 5.

2. Experiment 1b. Ex vivo glutamate and GABA, ΔFosB, c-Fos, 5-HT ect. markers in the habenula, rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and dorsal raphe nuclei (DRN) brain regions in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using ex vivo immunohistochemistry. See figure 5.

3. Experiment 1c. Retrograde tracing combined with immunostaining in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN) circuit projections in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during withdrawal from cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using in vivo tracing. We use a general retrograde monosynaptic tracer. It traces the glutamatergic projection neuron back to the habenula. By double immunostaining it can be identified with type of neurons in the target areas (rostral tegmental area, VTA, raphe nuclei) contact the glutamatergic projection neurons. The region of tracer injection will be determined based on experiment 1b. See figure 5.

4. Experiment 1d. Retrograde tracing of circuit projections in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats crossed with CAMKII::Cre (Recombinase expression in glutamatergic neurons) or GAD67::Cre (Recombinase expression in GABAergic neurons) or TH::Cre (Recombinase expression in Dopaminergic neurons), or TpH2::Cre (Recombinase expression in Serotonergic neurons) transgenic rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during withdrawal from cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using in vivo tracing in a cell-type specific manner. More specifically: LHb projection neurons are glutamatergic neurons, and they connect to GABAergic neurons in the rostral tegmental area, dopaminergic neurons in the VTA and serotonergic neurons in the raphe nuclei. They can also connect to glutamatergic neurons which are also found in all these brain regions. Here, we will investigate which of these neuronal cell types receiving glutamatergic input from the lateral habenula contributes to the behavioural changes observed in experiment 1a. We do this using a transsynaptic retrograde tracer, which infects the target glutamatergic, GABAergic, dopaminergic or serotonergic neuron and transfers the synapse and is taken up by the glutamatergic projection neuron from the habenula. The region of tracer injection and subsequent the cell-type specificity of the neural projection tracing will be determined based on experiment 1b and 1c. See figure 6.

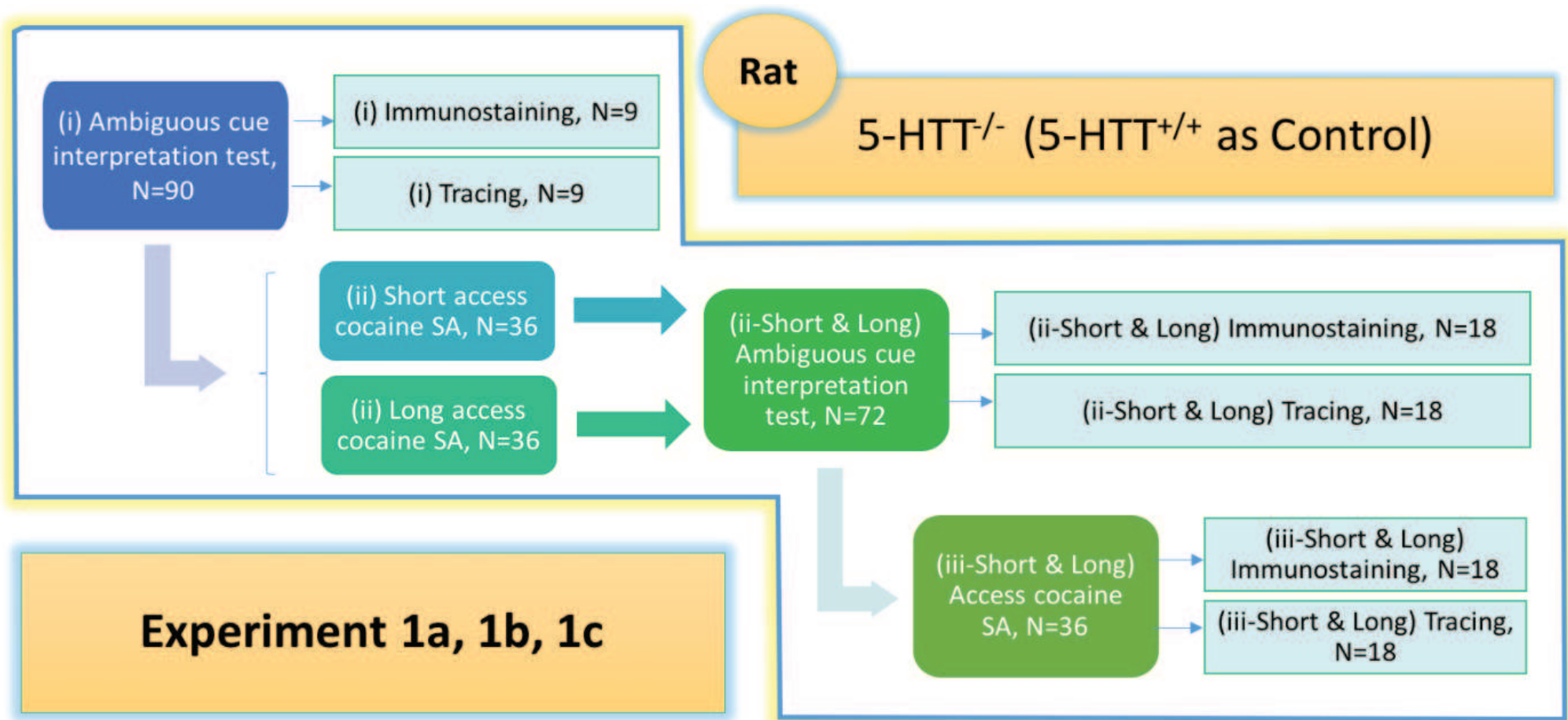


Figure 5. Outline of experiment 1a, 1b, 1c.

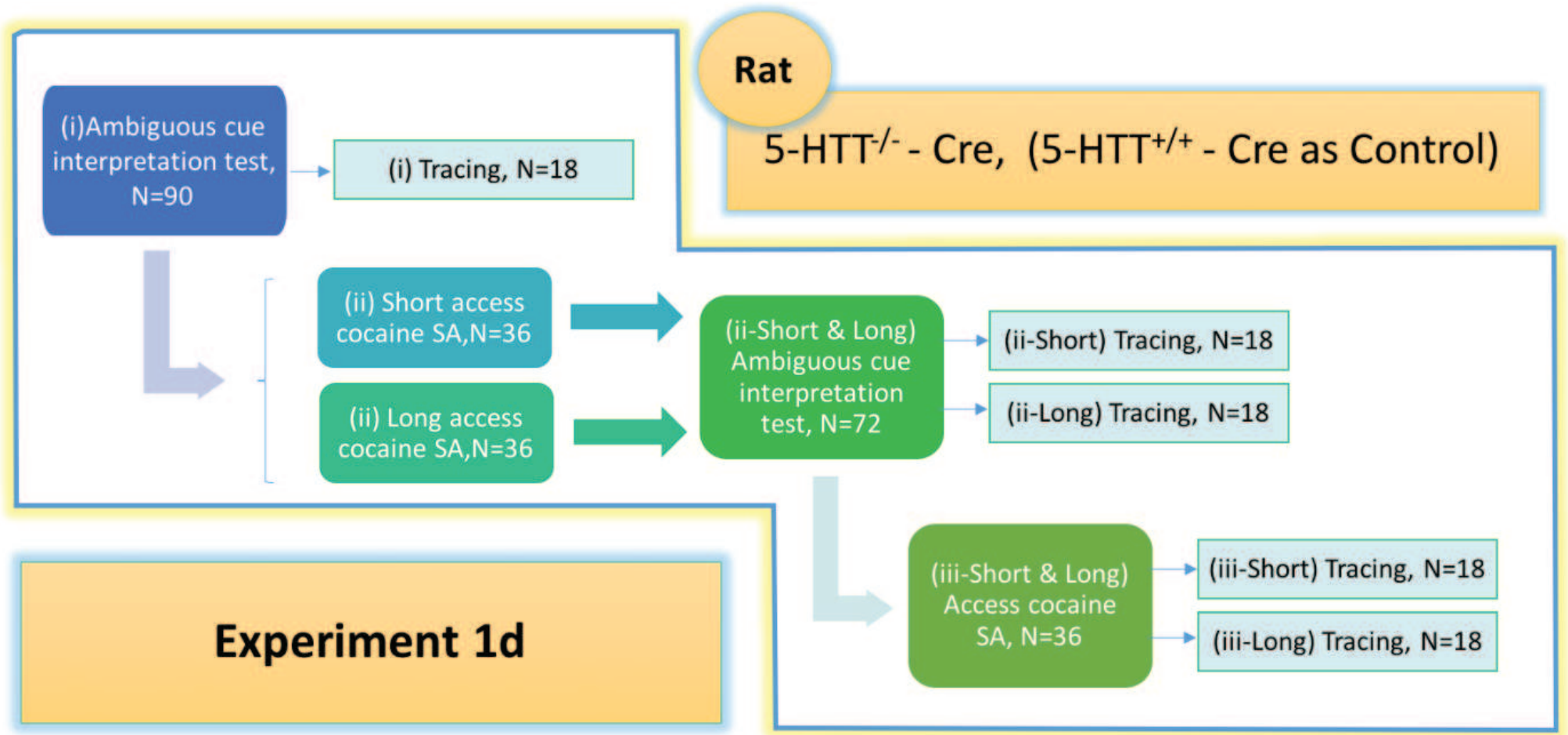


Figure 6. Outline of experiment 1d (cell-type specific tracing). Only one Cre rat and one projection area will be chosen to trace.

Go/no go decision point:

[REDACTED] We do make decisions for 1c and 1d, which are based on the outcome of experiment 1b. This is not a matter of finding a difference (we already have established that glutamatergic projection neurons are altered in serotonin transporter knockout rats, see figure 4), but a matter of what kind of difference. After experiment 1b, we will decide which brain area (connected to the lateral habenula) (experiment 1c) and which type of receiving neuron (experiment 1d) to focus on for the tracing study.

References

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

To address our objectives, wild-type and 5-HTT knockout (5-HTT^{-/-}) rat will be used. As outlined in the background, this rat line models the human 5-HTTLPR s-allele linked to depression and drug addiction. [REDACTED]

[REDACTED] For experiment 1c, 5-HTT^{-/-} and wild-type rats will be crossed with either CAMKII::Cre or GAD67::Cre transgenic rats, in order to obtain double transgenics expressing either recombinase in CAMKII neurons (i.e. glutamatergic neurons) or recombinase in GAD67 neurons (i.e. GABAergic neurons). The type of Cre transgenic rats we use depends on the outcome of experiment 1b and 1c. The Cre rats will be obtained through a collaboration with prof. dr. Dusan Bartsch (Mannheim, Germany).

To assess depression-like behaviour we use the ambiguous cue interpretation test (Enkel et al. 2010). This test measures the interpretation bias of the animals, which is negative in case of depression. We use this test, as it is deemed to test the pessimism aspect of depression (Enkel et al. 2010). Furthermore, since the ambiguous cue interpretation test makes use of discrete cues, which we also present during the cocaine self-administration procedure, we are able to measure the carry-over effects of changes in interpretation bias to cocaine self-administration, and vice versa.

We use the intravenous cocaine self-administration paradigm because it is the best model to measure addictive behaviour in rats; rats self-administer the same drugs as humans do (Kalivas et al. 2005). We use the short (1 hour per day in the self-administration cage) and long access (6 hours per day in the self-administration cage) to measure regular and compulsive cocaine self-administration behaviour, respectively (Ahmed et al. 1998). Hereby we study the addiction process: from regular (not addictive) to compulsive (addictive) behaviour. Compulsivity will not happen without a stage of regular drug intake, and the inclusion of both stages in the study will help to properly interpret the findings. Depression can be a pre-existing state, or can be drug induced (or exacerbated by drug exposure). This will be elucidated in this study.

Feasibility:

We identify the changes in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN) circuit associated with depression, cocaine addiction, and their comorbidity using in vivo neuronal tracing allow us to get an overview of the circuitry and to identify regions of projections where alterations have taken place.

References

Ahmed, S. and G. Koob (1998). "Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point." *Science* 282(5387): 298-300.

Enkel, T., D. Gholizadeh, O. v. B. und Halbach, C. Sanchis-Segura, R. Hurlemann, R. Spanagel, P. Gass and B. Vollmayr (2010). "Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats." *Neuropsychopharmacology* 35(4): 1008-1015.

[REDACTED]

Kalivas, P. W. and N. D. Volkow (2005). "The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice." *American Journal of Psychiatry* 162(8): 1403-1413.

[REDACTED]

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

In this study we will investigate the neural circuit function involving lateral habenula (LHb) in the comorbidity of depression and drug addiction as function of 5-HTT genotype. The experiments together address this aim. For this reason, depression-like and addictive behavior of the 5-HTT-/- rats and wild-type controls will be assessed first, followed by the measurement of the associated neural activity in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN). Next, we will assess the nature and structure of the connection of two regions within in the circuitry, and finally test/confirm the cell type of the connection.

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 and tracing

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 and tracing

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.

1 Experimental approach and primary outcome parameters

In the pilot study rats will be either intravenously equipped with a catheter or they will stereotactically receive a tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus. The surgery for the intravenous catheter implantation is terminal. The rats that will undergo the stereotactic surgery will recover from the surgery and sacrificed two-four weeks later. This is needed to determine, besides the location of the injection site, whether the tracer can be visualized in the habenula within two-four weeks and thus whether the tracing method works.

In experiment 1a, rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein. The rats are trained in the ambiguous cue interpretation test for depression, measuring pessimism versus optimism (**stage i**). After the ambiguous cue interpretation test the rats will be allowed access to cocaine, using self-administration cages. The animals will be withdrawn from cocaine self-administration and 24-72 hrs later they will be tested for depressive-like behaviour in the ambiguous cue interpretation test (**stage ii**). Thereafter the animals will be allowed to resume cocaine self-administration for 6 fixed ratio 1 (FR1) sessions of 6 hrs, after followed by decapitation (**stage iii**). Combining the results of the suggested experiments we aim to test whether there are differences in depression before or after cocaine self-administration and which comes first.

In experiment 1b, half of the rats tested in experiment 1a from **stages (i), (ii) and (iii)** are transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. Using immunohistochemistry we test changes in protein expression in habenula neurons and its projected areas associated with both drug addiction and depression mood

In experiment 1c, the other half of rats from **stages (i), (ii) and (iii)** tested in experiment 1a will be used for in vivo tracing. By using a classical non-cell-type specific method to trace neurons, we will define which areas of the neurons projected to by fluorescent immunostainings.

In experiment 1d, In order to focus our findings in experiment 1c, we will apply a cell-type specific rabies virus tracing to define the specific neuronal projection. Based on data derived from experiment 1b and 1c we make a considered choice for using either CAMKII::Cre or GAD67::Cre rats, TH::Cre or TpH2::Cre rats to target a specific cell type, and one stage and one projection.

General information is included as follow:

Experiment

primary outcome parameters

1a addiction and depression behavioural tests

Identifying differences of depression-like behaviour (interpretation bias) before cocaine self-administration and during withdrawal from short/long access cocaine self-administration

Assessing the amount of cocaine intake under short and long access cocaine self-administration conditions.

1b Immunostaining

Mapping protein expression changes in the Lhb-RMtg-VTA-DRN circuit in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

1c non-cell-type specific tracing

Identifying which areas targeted by efferent projections from the habenula are altered in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

1d cell-type specific tracing

Characterizing the cell-type specific efferent projection neurons from the habenula to target areas in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

Justification

Self-administration is the most used technique to measure the intake of drugs of abuse in animals. It has high face validity. Compared to repeated systemic injections of drugs of abuse, the self-administration procedures measures the voluntary intake of these drugs and is less stressful (no injections).

The tendency to interpret ambiguous situations pessimistically is a central feature of depression. The ambiguous cue interpretation paradigm can evaluate whether environmental (that is, cocaine exposure) and genetic factors contribute to a negative bias.

Immunostaining allows us to locate changes in protein expression in the LHB-RMtg-VTA-DRN circuitry.

We use neuronal tracing to find out connectivity changes in the Lhb-RMTg-VTA-DRN circuitry associated with the comorbidity between depression and cocaine addiction. In order to minimize the use of animals, we first perform non-cell-type specific tracing to identify the habenula efferents that are altered in association with depression, cocaine self-administration, their comorbidity, as function of serotonin transporter genotype, using the animals from experiment 1a. To confirm the neuronal cell-type of the altered projection of interest we will use serotonin transporter knockout and wild-type rats crossed with a transgenic recombinase rat. This allows us to trace the connection between the receiving neuron and the glutamatergic projection neuron from the habenula. See our explanation in the project proposal.

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

The 5-HTT knockout (5-HTT^{-/-}) rat (Slc6a41Hubr) has been generated by target-selected ENU-induced mutagenesis in a Wistar (Wistar/Crl) background. [REDACTED] 5-HTT^{+/+} littermates are used as controls. CAMKII::Cre (Recombinase expression in glutamatergic neurons) transgenic rats are rats in which the recombinase (Cre) enzyme is under the control of the CAMKII promotor in excitatory neurons (Schonig et al. 2012). GAD67::Cre (Recombinase expression in GABAergic neurons) transgenic rats are rats in which the Cre enzyme is under the control of the GAD67 promotor in inhibitory neurons. Both rats lines will be obtained through a collaboration with [REDACTED]. TH::Cre (Recombinase expression in dopaminergic neurons) and Tph2::Cre (Recombinase expression in serotonergic neurons) rats are already bred in our labs. At the age of 3 weeks, ear cuts are taken and used for genotyping. Animals are housed under standard conditions in groups of two per cage under controlled experimental conditions (12-h light-dark cycle, 21±1 °C, 60% relative humidity, food and water ad libitum), except where stated otherwise. Adult male and female rats are used see 'Choice and justification animals'.

Pilot study: One group of rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein (surgery time: approximately 45-60 minutes) and sacrificed after the surgery. The other group of rats will be stereotactically microinjected within the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe

nucleus with cholera toxin-subunit or rabies virus. Note that separate groups of rats are needed for either virus, because the tracers may well be transferred to the habenula with different speeds; we would to prevent that experiment 1c or 1d fails because of the tracers was not tested.

Experiment 1a. Depression-like behavior and cocaine self-administration in rats

Rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein (surgery time: approximately 45-60 minutes) and housed singly. After 6 days of recovery, the rats are trained in the ambiguous cue interpretation test for depression, measuring pessimism versus optimism. In depression there is a bias towards pessimism. Rats are tested in operant boxes. A positive tone (2kHz tone) signals the opportunity to gain a reward (sweetened condensed milk) by pressing the left lever (5 daily training sessions of 30 min). A negative tone (9kHz) precedes the occurrence of an electric foot-shock (60 s at max), which can be prevented or stopped by pressing the right lever (5 daily sessions of 30-60 min). After discrimination training (criterion: 70% correct discrimination between the negative and positive tone) rats are tested for their responses to ambiguous tones with intermediate frequencies (3, 5, and 7kHz). The rats' expectations of a positive or a negative event signalled by these tones were inferred from their lever responses (6 daily sessions of 30-60 min)(Enkel et al., 2010). 'Depressed' rats are expected to prefer the right lever. (**stage i**). After the ambiguous cue interpretation test the rats will be allowed to self-administer cocaine (0.50 mg/kg/injection, intravenous vein) via a fixed ratio 1 (FR1) lever press response for 1 h/day for 10 days using self-administration cages. There will be a second inactive lever in the chamber. This lever has no programmed consequences, but will serve as a control for any non-specific effects. The ambiguous cue used in the ambiguous cue interpretation test signals the location of the active lever, which allows us to assess the initial influence of the rats mood state on cocaine self-administration. Once rats have acquired cocaine self-administration, defined as at least 10 reinforced responses over 1 h with less than $\pm 20\%$ variation in responding from day to day, half of the rats will get extended access to cocaine (6 h daily sessions), for a minimum of 15 sessions under an FR1 schedule of reinforcement until cocaine intake significantly increases (escalation; a hallmark of compulsive cocaine self-administration). The other half of the rats remain on the 1 h schedule to assess regular cocaine self-administration. For the 9 subsequent sessions, rats will be allowed to self-administer cocaine under a progressive ratio (PR) schedule every 3 days, while an FR1 schedule will be used on the two intervening sessions. The PR schedule is based on the following equation: responses/injection $[5 \times e(\text{injection number} \times 0.2)] - 527$, and results in the following sequence of response ratio's: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, etc. PR sessions, set at a maximum of 6 hrs, will start when self-administration escalates during extended access (significant increase in cocaine infusions compared to the first extended access session). Once per week the ambiguous cue interpretation training is repeated next to the self-administration session, to keep the rat's memory for the positive and negative tones. The animals will be withdrawn from cocaine self-administration and 24-72 hrs later they will be tested for depressive-like behavior in the ambiguous cue interpretation test. Only the probe test will be repeated, taking one session. (**stage ii**). Thereafter the animals will be allowed to resume cocaine self-administration for 6 FR1 sessions of 6 hrs, followed by decapitation at 24 hrs into withdrawal (**stage iii**). The dependent measurements in the cocaine self-administration procedure include total intake over different sessions, intake during the first hour of daily self-administration, changes in cocaine-loading behavior (first 10 min interval of exposure to daily cocaine self-administration), and breakpoint (final attained ratio). In the ambiguous cue interpretation test we will measure the number of left and right lever responses to ambiguous cue presentation.

The offspring of serotonin knockout rats (5-HTT-/-) used in the experiment will be bred as follows:

Mother	Father	Offspring	Group
5-HTT ^{-/+}	5-HTT ^{-/+}	5-HTT ^{-/-}	Subject
		5-HTT ^{+/+}	Control

Experiment 1b. Expression of genes in the habenula, rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and dorsal raphe nucleus (DRN)

Half of the rats tested in experiment 1a are transcardially perfused with 4% paraformaldehyde: (i) 24 hours after the ambiguous cue interpretation test, (ii) 24 hours after the ambiguous cue interpretation test taking place during withdrawal from regular or compulsive cocaine self-administration, (iii) 24 hours after the last regular or compulsive cocaine self-administration session. Coronal sections corresponding to the LHb, RMTg, VTA and DRN are immunohistochemically double/triple stained for 1) delta FosB (marker for chronic neuronal activation); 2) GAD67 (Glutamate decarboxylase 67, marks GABA-ergic neurons); 3) Vglut1-3 (vesicular glutamate transporter, marks glutamatergic neurons, the expression of the subtype is region specific), 4) TpH2 (marks serotonergic neurons); 5) TH (marks dopaminergic neurons); 6) 5-HT (serotonin).

Experiment 1c. Retrograde tracing of lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit projections.

The other half of rats from stages (i), (ii) and (iii) tested in experiment 1a will be used. Based on data derived from experiment 1a and 1b we may make a considered choice for one stage and/or one projection.

Classical non-cell-type specific method: The rats are stereotactically microinjected with CTb (cholera toxin-subunit) conjugated with Alexa into the VTA, DRN or RMTg under isoflurane anesthesia. Because CTb can serve as retrograde neuron trace marker, the injections will take place in afferent regions, which receive input from the LHb. The decision which afferent to focus on will depend on the data obtained in experiment 1b. The actual location and spread of the CTb is determined afterward using fluorescent microscopy (only first-order neurons can be detected, as it is a monosynaptic tracer). After 1 week rats are transcardially perfused using 4% paraformaldehyde. By combining with immunohistochemistry for GAD67, Vglut, TpH2, and TH, we will characterize the cell-type of the target neurons in the afferent region receiving glutamatergic input from the LHb. We choose this approach as explorative tracing method, because we do not know whether serotonin transporter genotype and/or experimental stage affects known projections in the LHb-RMTg-VTA-DRN circuit (Figure 2), and to minimize the number of animals.

Experiment 1d. Cell-type retrograde tracing of lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit projections

Cell-type specific tracing method: To confirm the data from exp 1c and demonstrate that a projection of a specific neuronal cell-type is altered we will apply a cell-type specific tracing approach in experiment 1d using rabies virus. To this end we use a new group of rats. Specifically, we use CAMKII::Cre, GAD67::Cre; TH::Cre or Tph2::Cre transgenic rats bred to 5-HTT knockout rats or wild-type rats. Cre-negative animals are used as

control. Because the breeding is laborious, we will make here a considered choice for one type of breeding (5-HTT x CAMKII::Cre, GAD67::Cre, TH::Cre or Tph2::Cre). The breeding will be conducted as follows:

Generation	Mother	Father	Offspring	Group
First	Cre ^{+/+}	5-HTT ^{-/-}	5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-}	
Second	5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-}	5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-}	5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-}	Subject
			5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-}	Control
			5-HTT ^{-/-} - Cre ^{-/-}	Control
			5-HTT ^{+/+} - Cre ^{-/-}	Control

First, female Cre rats will be crossed with male 5-HTT^{-/-} rats to obtain first generation (G1) 5-HTT^{-/+}-Cre rats; Second, we inbreed Generation 1 to obtain Generation 2: male 5-HTT knockout rats expressing Cre in a particular cell type (5-HTT^{-/-} - Cre^{+/-} or 5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-}), male 5-HTT knockout rats not expressing Cre (5-HTT^{-/-} - Cre^{-/-}), male 5-HTT wild type rats with Cre being expressing in a particular cell type (5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-} or 5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-}) and male 5-HTT wild-type rats not expressing Cre (5-HTT^{+/+} - Cre^{-/-}). Note that we use controls for both 5-HTT^{-/-} and Cre expression. It is necessary to control also for Cre expression to exclude the possibility that Cre expression itself influences brain function.

The viral vectors to be used are Cre-dependent AAV-DIO-TVA and AAV-DIO-RG helper viruses, which are injected on day 1 into the ventral tegmental area (VTA), dorsal raphe nuclei (DRN) or rostromedial tegmental nucleus (RMTg) stereotactically under the isoflurane anesthesia. We choose one of the area based on experiment 1b; because rabies virus serves as a transsynaptic retrograde tracer, the injections will take place in afferent regions, which receive input from the lateral habenula (LHb). 21 Days later the EnvA-coated Rabies virus (a genetically modified rabies virus pseudotyped with the avian virus envelope protein (EnvA)) is injected at the same coordinates. As the rabies virus can only transduce cells expressing the TVA receptor, initial transduction and labeling is limited to Cre-expressing neurons. After retrograde transsynaptic labeling of input neurons, further spread of the rabies virus is inhibited due to the RG deletion. In summary, the TVA receptor expression restricts the uptake of the EnvA-pseudotyped rabies virus specifically to Cre-expressing neurons and the RG expression determines the strict monosynaptic spread. After 1 week rats are transcardially perfused using 4% paraformaldehyde to immunostaining.

References:

Enkel, T., D. Gholizadeh, O. v. B. und Halbach, C. Sanchis-Segura, R. Hurlemann, R. Spanagel, P. Gass and B. Vollmayr (2010). "Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats." *Neuropsychopharmacology* 35(4): 1008-1015.

Schonig, K., T. Weber, A. Frommig, L. Wendler, B. Pesold, D. Djandji, H. Bujard and D. Bartsch (2012). "Conditional gene expression systems in the transgenic rat brain." *Bmc Biology* 10.

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

Pilot study: We use N = 10 per condition and sex: 1. Intravenous catheterization, 2. CTb tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus, 3. Rabies virus tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus. Since male and female rats are anatomically different (e.g. brain coordinates may differ, and the distance between the vene jugularis location of catheter insertion and the heart), it is important to use both males and females for the pilot. We do not consider genotype, since we do not have indications that these anatomical factors differ between the genotypes. Total: 60 rats

Exp 1a-1d: Based on previous behavioural and self-administration studies () and the fact that we split groups (after behavioural testing) into groups for tracing and immunohistochemistry we estimate that we need N=18 for experiment 1a, 1b, 1c, 1d (see figure 5 & 6). Rats are tested in groups, always with experimental animals and controls matched. In sum, we need total 90 rats per genotype in experiment 1a, 1b, 1c for each sex (figure 5; 6) (NB: because Cre-negative animals are used as controls we will have four groups for experiment 1d: 5-HTT+/+ and 5-HTT-/-, and Cre+ and Cre-). A power analysis will be conducted for the protocol, and data will be analyzed using unpaired two-tailed t-test; one, two or three-way ANOVAs; one, two or three-way repeated measures ANOVAs.

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 1140. The animal origin is described in the Table below.

Experiment	Origin	Genotype	Gender	Maximum Number	Life stage
Pilot			Female	30	
			Male	30	
1a, 1b, 1c		5-HTT ^{-/-}	Male	90	
			Female	90	
		Wild type (5-HTT ^{+/+})	Male	90	
			Female	90	
1d		5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/+}	Male	90	
			Female	90	
		5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/+}	Male	90	
			Female	90	
		5-HTT ^{+/+} - Cre ^{-/-}	Male	90	
			Female	90	
		5-HTT ^{-/-} - Cre ^{-/-}	Male	90	
			Female	90	

References

[REDACTED]

B. The animals

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

We use rats, because the intravenous drug self-administration has been developed for rats and does not work for mice.

We use both male and female rats, because drug addiction is more prevalent in males compared to females (SAMHSA 2014, EMCDDA 2016), while depression rates are higher in females than in males (Piccinelli and Wilkinson 2000, Romans, Tyas et al. 2007). Whether their comorbidity specifically affects males or females is unclear. For that reason we will test both sexes.

We use 5-HTT^{-/-} and wild-type rats, because 5-HTT^{-/-} rats (when compared to wild-type counterparts) display increased depression-like behaviour [REDACTED] increased intravenous cocaine self-administration [REDACTED].

We use CAMKII^{::Cre} (Recombinase expression in glutamatergic neurons), GAD67^{::Cre} (Recombinase expression in GABAergic neurons), TH^{::Cre} (Recombinase expression in Dopaminergic neurons), or TpH2^{::Cre} (Recombinase expression in Serotonergic neurons) rats (which we cross to 5-HTT^{-/-} or wild-type rats) because we aim to trace and manipulate glutamatergic, GABAergic, dopaminergic, or serotonergic neurons in the 5-HTT^{-/-} and wild-type rats using Cre-dependent viral vectors.

For the pilot study genotype is not relevant. We use wild-type or 5-HTT^{-/-} rats, whatever is available/left over from the breeding.

References

Canterberry, M., M. R. Peltier, K. T. Brady and C. A. Hanlon (2016). "Attenuated neural response to emotional cues in cocaine-dependence: a preliminary analysis of gender differences." *Am J Drug Alcohol Abuse* 42(5): 577-586.

EMCDDA (2016). "European Drug Report 2016: Trends and Developments." *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*.

[REDACTED]

Kohtz, A. S. and G. Aston-Jones (2016). "Cocaine Seeking During Initial Abstinence Is Driven by Noradrenergic and Serotonergic Signaling in Hippocampus in a Sex-Dependent Manner." *Neuropsychopharmacology*.

Piccinelli, M. and G. Wilkinson (2000). "Gender differences in depression." *Critical review* 177(6): 486-492.

Romans, S. E., J. Tyas, M. M. Cohen and T. Silverstone (2007). "Gender differences in the symptoms of major depressive disorder." J Nerv Ment Dis 195(11): 905-911.

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 (wild-type)	own breeding	180	PND70-140
Rat (5-HTT-/-)	own breeding	180	PND 70-140
Rat (wild-type - Cre-)	own breeding	180	PND 70-140
Rat (5-HTT-/- - Cre-)	own breeding	180	PND 70-140
Rat (wild-type - Cre+)	own breeding	180	PND70-140
Rat (5-HTT-/- - Cre+)	own breeding	180	PND70-140
Rat (pilot)	own breeding	60	PND70-140

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 psychiatric disorders. Because of the complexity of these kind of

disorders, it is impossible to use less complex animals. Indeed, the intravenous cocaine self-administration paradigm does even not work in mice, let alone in invertebrate animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

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 a variety of behavioral paradigms and be used for ex vivo studies and non-cell-type specific tracing to obtain a high number of information thereby leading to a minimal amount of animals needed. Experiment 1d will only focus on one of the projections in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit. This will lead to reduce the amount of animal needed.

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 (intravenous catheter implantation and intracerebral infusion of tracers/viral vectors) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. Before and 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.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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.

The rats will be singly housed after surgeries. Cage mates are removed because they will damage the cannula or the catheter. Given that a collision with the sharp edges of a shelter may result in the loss of the cannula, shelters are replaced by wooden blocks and nest material.

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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 spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. 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?

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. The rats are socially isolated during cocaine self-administration. This causes stress. In the ambiguous cue interpretation test the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. 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. The animal's welfare may also be affected by the lack of a shelter or cage mates. Cocaine self-administration itself is not compromising health. Time out periods in the experimental procedure prevents overdoses. During the long access condition, when rats are expected to develop compulsive cocaine self-administration, a hallmark of addiction, rats are tested every day to prevent withdrawal effects. The exception is the measurement of depression-like behaviour during withdrawal (stage II of experiment 1a), which is inherent to the experimental procedure.

Explain why these effects may emerge.

In the ambiguous cue interpretation test the rats can lever press to avoid shocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, and transgenic rats are

better to do so than wild-type rats. These stressors are necessary to measure a depression-related phenotype In experiment 1a depression-like behaviour will be measured during withdrawal from cocaine self-administration, because in humans depression emerges during withdrawal (and motivates the continuation of drug use). There, withdrawal for measuring the comorbidity between depression and cocaine addiction is unavoidable. Finally, it is essential to socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social housing starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional (otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment).

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

Although some stressors are inherent to the experimental design, we will take precautionary measures to minimize all other potential causes of (additional) stress to the animals, by handling the animals extensively and providing the animals wooden blocks and nest material as cage enrichment.

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.

Yes.

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 cannula some additional endpoints are taken into account: losing of the cannula 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 the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.

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	
Terminal	Male and female	1 surgery terminal anesthesia	20	Pilot	2%
Moderate	Male and female	1 surgery	40	Pilot	4%
Moderate	5-HTT+/+ male and female rats	1-2 surgeries	180	1a, 1b, and 1c	47%
Moderate	5-HTT+/-Cre male and female rats	2 surgeries and increased depression-like behaviour	360	1d	
Severe	5-HTT-/- male and female	1-2 surgeries and increased depression-like behaviour	180	1a, 1b, and 1c	47%
Severe	5-HTT-/-Cre male and female	2 surgeries and increased depression-like behaviour	360	1d	

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.

Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for immunohistochemistry or validation of the placement of the cannula or injection site.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 9101, 
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002017872

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2017. Het gaat om uw project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017872. 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:

17 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017872

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

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 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

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

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- ☐ Een projectvergunning aanvragen
- ☐ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- ☐ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☒ Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- ☒ Nieuwe aanvraag
- ☐ Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 17 maart 2017
Geplande einddatum: 17 maart 2022
Titel project: The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
Titel niet-technische samenvatting: Comorbiditeit tussen depressie en cocaine verslaving: de rol van de habenula
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ()
E-mailadres DEC: ()

Datum:

17 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017872

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: [x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: [x] Melding Machtiging
[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: Pieter Verbost
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 17 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101, t.a.v. [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
AVD103002017872

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 februari 2017

Vervaldatum: 19 maart 2017

Factuurnummer: 170872

Ordernummer: 040823-461220 /2016-0078 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017872	€ 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: maandag 6 maart 2017 14:17
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende vraag aanvraag AVD103002017872

Geachte RUDEC,

Op 17 februari 2017 heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" en aanvraagnummer AVD103002017872. We danken u voor dit mooi en uitgebreid advies. We hebben toch een vraag erover.

Bij vraag C10 schrijft u dat de huisvesting en verzorging van de dieren conform de eisen in de bijlage III van de richtlijn zijn. In de aanvraag staat dat dieren individueel worden gehuisvest en u heeft bij vraag C11 aangegeven dat er sprake is van individuele huisvesting. We zouden graag willen vragen of het antwoord bij vraag C10 een kennelijke fout was of ziet de DEC die vraag anders?

We zouden u antwoord graag voor vrijdag 10 maart willen ontvangen.

De CCD heeft de aanvrager gevraagd om de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie tot het bereiken van HEP kan leiden nader uit te leggen.

Alvast hartelijk dank.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 6 maart 2017 13:44
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002017872

Geachte [REDACTED],

In uw aanvraag met titel 'The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula' en aanvraagnummer AVD103002017872 zitten voor ons enkele onduidelijkheden.

In de bijlage dierproeven, onder punt J. Humane endpoints, schrijft u '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 the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.' We zouden graag meer willen weten over de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie kan leiden tot het toepassen van de HEP. Gaat het hier over de vaardigheden van de mensen die de operatie uitvoeren, over de techniek op zich, over mogelijke infecties, over de lokalisatie van het virus?

Graag ontvangen we uw antwoord uiterlijk donderdag 9 maart 2017 om uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [redacted] namens [redacted]
Verzonden: donderdag 9 maart 2017 17:31
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende vraag aanvraag AVD103002017872
Categorieën: Dossier: [redacted]

Beste [redacted],

In overleg met de voorzitter van de RUDEC kom ik tot het volgende antwoord op uw vraag.

In de EU-richtlijn staat in de Algemene Bepalingen Artikel 33 (**Verzorging en huisvesting**):

1. Wat betreft de verzorging en de huisvesting van de dieren dragen de lidstaten er zorg voor dat:

- a) alle dieren huisvesting, een omgeving, voedsel, water en verzorging ontvangen die passend zijn voor hun gezondheid en welzijn;
- b) iedere inperking van de mogelijkheid van de dieren om aan hun fysiologische en ethologische behoeften te voldoen, tot een minimum wordt beperkt;
- c) de omgevingsomstandigheden waarin de dieren worden gefokt, gehouden of gebruikt, dagelijks worden gecontroleerd;
- d) regelingen worden getroffen om een eventueel letsel of pijn, onnodig lijden, angst en blijvende schade die vermijdbaar zijn en die worden ontdekt, zo snel mogelijk te verhelpen, en
- e) de dieren onder behoorlijke omstandigheden worden vervoerd.

2. Met het oog op het bepaalde in lid 1, zorgen de lidstaten ervoor dat de in bijlage III omschreven verzorgings- en huisvestingsnormen worden toegepast met ingang van de in die bijlage gespecificeerde data. NL 20.10.2010 Publicatieblad van de Europese Unie L 276/

3. De lidstaten kunnen om wetenschappelijke redenen, of redenen van dierenwelzijn of diergezondheid afwijkingen van lid 1, onder a), en lid 2 toestaan.

Uit punt 3 blijkt dat om wetenschappelijke reden of redenen van dierenwelzijn afgeweken kan worden van 'normale' huisvesting. De individuele huisvesting van dieren om te voorkomen dat hun canule beschadigd wordt door een kooigenoot is in onze ogen dus niet afwijkend van hetgeen in de richtlijn staat.

In bijlage III wordt hier ook naar verwezen: Met uitzondering van de soorten die van nature solitair zijn, moeten dieren in sociaal verband worden gehuisvest in stabiele groepen van compatibele individuen. In gevallen van afzonderlijke huisvesting op grond van artikel 33, lid 3, moet de duur van de afzondering tot het noodzakelijke minimum worden beperkt en moet het visuele, auditieve, olfactorische en/of tactiele contact worden gehandhaafd. De introductie of herintroductie van dieren in bestaande groepen moet zorgvuldig in het oog worden gehouden, teneinde problemen als gevolg van onverenigbaarheid of verstoorde sociale relaties te vermijden.

Dieren die individueel gehuisvest zijn hebben wel visueel, auditief en olfactorisch contact. Hierdoor is de individuele huisvesting van de dieren volgens de RUDEC conform de eisen in bijlage III van de richtlijn.

Graag hoor ik of de CCD het eens is met deze redenering.

Vriendelijke groeten,

[redacted]
[redacted]
[redacted] Dierexperimentencommissie
[redacted]
[redacted]

Secretariaat:
[redacted]

Dr. [REDACTED]

Thank you for evaluating our DEC application with number AVD103002017872. We received this remark:

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 the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.' We zouden graag meer willen weten over de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie kan leiden tot het toepassen van de HEP. Gaat het hier over de vaardigheden van de mensen die de operatie uitvoeren, over de techniek op zich, over mogelijke infecties, over de lokalisatie van het virus?

This is our reply:

Thank you for your kind and important comment. The reasons why there is 20% chance that rats may meet to the humane end point are as follows:

- 1) The neural areas we focus on are quite small and most of them are located deep in the brain which are not easy to reach. There is chance that we miss target the regions, because there are small differences between brains of rats and we have to rely on the average brain atlas of the rat.
- 2) Although we will give the rats antibiotic treatment, there are still some unknown risks that the rats may get infected after the surgeries.
- 3) The experiments we propose are long lasting. It is not trivial to keep the catheters open for the whole duration of the experiment. It can happen that blood clots develop and occlude the catheter. We undertake precautions, but this cannot be fully prevented.
- 4) Part of the rats will undergo two dedicated surgeries; the implantation of an intravenous catheter and the stereotact injection of a viral tracer. This doubles the risk that something happens during or after surgery.

We are highly experienced in these surgeries, but please appreciate that these surgeries are complex. The best experts experience some dropout of animals. A 100% success rate is not realistic.

In sum, it is the complexity of the surgeries and the fact that the animals have to undergo the surgery twice that there is 20% chance that the rats may meet the criteria of the humane end points.

Kind regards,

[REDACTED]

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0078
2. Titel van het project: The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
3. Titel van de NTS: Comorbiditeit tussen depressie en cocaïneverslaving: de rol van de habenula
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: 17-11-2016
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 06-12-2016 en 10-01-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 12-12-2016 tot 22-12-2016 en 17-01-2017 tot 31-1-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 22-12-2016 en 31-01-2017
 - ☒ advies aan CCD: 17-02-2017
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:
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 12-12-2016
 - Datum antwoorden: 22-12-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

 - De projectaanvraag is voor de DEC-leden slecht te volgen (zoals de zin bovenaan pagina 35) en daarnaast lastig leesbaar door de vele grammaticale en spellingsfouten en woordverwisselingen (zoals day i.p.v. cage op pagina 18). De commissie verzoekt de

onderzoekers de projectaanvraag makkelijker leesbaar te maken door zorgvuldiger en helderder te formuleren, en bovendien de verschillende onderdelen kort en bondig te beschrijven en informatie die bij dat onderdeel niet gevraagd wordt weg te laten (zoals bijvoorbeeld bij DAP1 onderdeel H waar uitsluitend informatie met betrekking tot pijn en pijnbestrijding wordt gevraagd). De CCD heeft een uitgebreide toelichting gemaakt waarin duidelijk staat vermeld wat bij alle onderdelen ingevuld dient te worden.

- *Antwoord: We corrected grammatical errors in the text, words have been replaced (e.g. day instead of cage), and we have removed the irrelevant information in DAP1 part H. Note that we cannot avoid the naming of brain regions or the technical names of transgenic animal models and vectors, etc.*

Project Proposal:

-3.1: Figuur 1 onderdeel A is een verhelderende illustratie van de positie van de habenula in knaagdierhersenen. De commissie verzoekt u onderdeel B over vishersenen te verwijderen.
Antwoord: We have removed the picture of the fish brain.

-3.4 De experimenten voorafgaand aan het go/no go moment zijn navolgbaar. Het design van de experimenten voor onderdeel 1d en 2 is sterk afhankelijk van de resultaten van de experimenten 1a, 1b en 1c. De commissie is van mening dat onderdelen 1d en 2 van de projectaanvraag nog te prematuur zijn om deze goed te kunnen overzien en te beoordelen. Zoals het nu is geformuleerd laat de tekst teveel ruimte om dit onderdeel later naar eigen inzicht in te vullen. De commissie kan dit onderdeel daarom niet toetsen. De commissie adviseert u deze delen op dit moment niet aan te vragen. Op basis van wat er nu staat zal zij daarover negatief adviseren.

Antwoord: The reasons why we want

[REDACTED]

We know that glutamatergic projections are altered, and now we want to define to which areas the neuron that are altered project to. In our view this is logical next step based on firm preliminary data. The purpose of experiments 1a, 1b, 1c, and 1d are to figure out, step by step which of the most significant efferent projections of the lateral habenula neurons have been disturbed, and the cell type of the receiving neurons. We believe that experiment 1d belongs to this aim; experiment 1d is a finetuning of experiment 1c: whereas we determine in experiment 1b the which target area receives differential input from glutamatergic projection neurons from the lateral habenula, in experiment 1d we confirm the type of neuron in the target area that receives the glutamatergic input from the habenula. This information is needed for a causal intervention, as we intended to do in experiment 2. We have now formulated the purpose of the experiments in a different way in the application. It was placed in DAP2 according to advice of the IvD, but after own reconsiderations we strongly believe that experiment 1d belongs to DAP1. We agree that experiment 2 is dependent on the outcome of the tracing studies, and we will ask permission for experiment 2 in a separate DEC application. So, experiment 2 is removed from the current application, and we have only one DAP now.

-3.4: Waarom willen de onderzoekers zowel lange als korte blootstelling aan cocaïne onderzoeken? Dit is niet afdoende onderbouwd.

Antwoord: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration (Ahmed and Koob, 1998; Science). The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration. We have added this information in this section.

-3.4.1 en 3.4.3: Het genoemde go/no go beslismoment is niet beschreven bij 3.4.3. Wat gaan de onderzoekers doen als zij alleen verschil vinden in depressie of genotype? Zie ook de eerste vraag hierboven over 3.4.

Antwoord: [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] As to whether there are differences in depression before or after cocaine self-administration is not a go / no go decision point, as it is not known for the comorbidity between cocaine addiction and depression what comes first, the addiction or depression. Either is possible, and this study will clarify this. We believe that if we remove experiment 2 from this DEC we have no go/no go decision left over; As indicated in response to point 3.4; we already know that glutamatergic projection neurons are altered in naïve serotonin transporter knockout rats and those with a history of short- and long access self-administration. We will now define to which areas these neurons project to, and with which type of neurons in these projection areas they have connections to. We do make decisions for 1c and 1d, which are based on the outcome of experiment respectively 1b and 1c. This is not a matter of finding a difference or not, but a matter of what kind of difference. Thus, we believe that a go / no go decision in terms whether we should continue with the next experience is not applicable in the new situation where we have removed DAP2. after 1b experiment, we will decide one of the brain areas (connected with lateral habenula) to perform trace study (experiment 1c). We have enriched this information in this section.

-3.4.1: Onderdeel 1a: waarom wordt de test niet ook tijdens cocaïne blootstelling gedaan?

Antwoord: This is because it is impossible to combine the ambiguous cue interpretation test with the self-administration test in one test. The rats then would have to respond simultaneously to get cocaine, food and to avoid shocks. This will become a very messy experiment. Moreover, we would like to investigate depression at baseline, because in drug addicts showing depression and addiction comorbidity the chicken and the egg are not clear; in animals we can study what comes first: the depression or the addiction. By measuring depression under baseline conditions, and thereafter during withdrawal, we will be able to dissociate the chicken and the egg. Moreover, negative emotional states like depression are specifically seen in drug addicts during withdrawal, when the drug is not on board anymore. This is way we measure depression (besides during baseline), also during withdrawal.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-A: Graag alle informatie geven bij elk onderdeel zoals het is gevraagd en toegelicht in de handleiding van de CCD.

Antwoord: We have added information to this section

-A2: Gemeld wordt dat het experiment alleen in mannelijke ratten wordt uitgevoerd. In de tekst en de tabel bij onderdeel B wordt het gebruik van zowel mannen als vrouwen beschreven. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen.

Antwoord: After discussion with the IvD before, we changed our plan to use both sexes in this proposal at the end. The rationale was indeed not optimal. We have changed the rationale in the application. Important is that drug addiction is more prevalent in men, and depression in women. Potential sex difference in the development of the comorbidity are not known. This would be great to unravel.

-A2: Het is niet gebruikelijk om oorknipjes onder anesthesie te geven.

Antwoord: This depends on whom we are talking to. We are happy to take earcuts without anaesthesia. We have changed this in the proposal.

-A1 (eerste zin): De commissie adviseert de onderzoekers het woord 'Wistar' weg te laten wanneer niet alleen wildtype Wistar ratten worden bedoeld.

Antwoord: The word has been removed from the proposal.

-A2, exp. 1d: De benodigde 5HTT-/- Cre dieren ontbreken in de tabel met kruisingen. Zoals hierboven al aangegeven, is de commissie bovendien van mening dat het vragen van een vergunning voor dit experiment prematuur is.

Antwoord: These animals have been added to the table.

-B: De commissie vindt de gegeven reden (onienigheid in literatuur of verslaving vaker voorkomt in een van beide geslachten) voor het uitvoeren van alle experimenten in zowel mannen als vrouwen niet terzake doende. Zij is derhalve van mening dat de doelstelling van de projectaanvraag behaald kan worden door dieren van één geslacht te gebruiken, hetgeen tot een significante reductie in het gebruik van dieren met licht tot ernstig ongerief zal leiden.

Antwoord: We prefer to use both males and females. In patients, addiction is more prevalent in males, but females have a higher risk to be diagnosed with depression. The question is whether their comorbidity specifically affects males or females. We will reveal whether there are sex differences in development of the comorbidity and the underlying mechanisms. For that reason we will test both sexes. This also justified in our proposal.

-D: Wat bedoelen de onderzoekers met de opmerking over het gedeeltelijk schoonmaken van de kooien? Is dat specifiek voor dit onderzoek van belang, en is de te volgen procedure uniek voor deze projectaanvraag?

Antwoord: This is because that it reduces the stress of a fully clean cage. We do this in our other approved DEC (2015-0021) as well. We want to prevent that stress interferes with the behavioural measurements; stress can increase drug self-administration and is an important trigger for depression. Given the longitudinal set-up of the experiment we will have to clean cages, but want to prevent in this way that any stress interferes with the behavioural measurements.

-I en K: Wat is het ongerief van de ambiguous cue test, en hoe lang duurt de individuele huisvesting? De commissie mist beide elementen in de beschrijving van het cumulatief ongerief bij K.

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

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the ambiguous cue interpretation test the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. The rats can escape the footshocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, [REDACTED] In the ambiguous cue interpretation test we expect that transgenic rats bias more attention towards shock escape than to earning a reward.

The animals submitted to the ambiguous cue interpretation test will experience moderate stress. In this test the rats may experience the moderate stress in the training phase in which they will be submitted to foot-shocks, and after training if they present a higher depression-like symptom, they may still experience this stress.

-K: Het ongerief voor de dieren die één operatie ondergaan in combinatie met de overige handelingen is matig.

Antwoord: Thanks for reminding. We have replaced it.

***DAP2**

De DEC wijst u er op dat zij hierboven heeft aangegeven het vragen van een vergunning voor deze experimenten op dit moment prematuur te vinden.

Antwoord: We have removed DAP2

Niet technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: We have adjusted the NTS.

- Gestelde vragen en antwoorden:
- Datum vragen: 17-01-2017
- Datum antwoorden: 31-01-2017

Project Proposal:

- Op sommige plaatsen (bv. 3.4.2) wordt nog verwezen naar het (inmiddels verwijderde) experiment 2. S.v.p. alle verwijzingen verwijderen.

Antwoord: We have removed references to Experiment 2 were we could find it.

-De commissie heeft de onderzoekers eerder gevraagd uit te leggen waarom zij zowel lange als korte blootstelling aan cocaïne willen onderzoeken, maar is nog niet tevreden met het gegeven antwoord. Nadat dieren geleerd hebben om zichzelf cocaïne toe te dienen via een fixed ratio 1 schema in experiment 1a, wordt de groep in tweeën gesplitst waarbij de helft toegang krijgt tot langdurige zelf-toediening (compulsive self-administration) terwijl de andere helft op het reguliere schema (regular drug self-administration) blijft. Zowel het antwoord op vraag 3.4 als de uitleg op pagina 21/37 maakt de commissie niet duidelijk waarom beide toedieningsvormen nodig zijn. Het gaat er toch alleen maar om de dieren verslaafd te krijgen. Een en ander betekent dat de commissie op dit punt geen gefundeerde ethische afweging kan maken. De commissie verzoekt aanvragers om op dit punt helderheid te verschaffen.

Antwoord:

Short access = regular drug self-administration

Long access = compulsive drug self-administration

*Please see our previous answer: Reply: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration (Ahmed and Koob, 1998; Science). The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. **Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration.***

The research topic is about the comorbidity between addiction and depression. However, this final stage does not build up directly from a healthy condition. People first start to use drugs on a regular basis, while drug use is still under control. So, self-administration per se is not addictive behaviour; like we may drink every evening a glass of wine during dinner. In a subset of drug users this regular use turns into compulsive use (i.e. uncontrolled use) and depression emerges (or was already present before and represents a reason to start using drugs in the first place). We cannot skip this regular drug intake phase, because then compulsive drug intake will not happen. Furthermore, this regular drug intake phase is needed to properly interpret findings. Indeed, a computational theory of cocaine addiction suggests that cocaine reinforces behavior due to its rapid homeostatic corrective effects, whereas its chronic use induces slow and long-lasting changes in homeostatic set-point (Keramati, Durand et al. 2017). Without the regular self-administration group, conclusions about the compulsive drug self-administration effects would be different. We have tried to make this clear throughout the proposal.

Description of Animal Procedures:

-B: Er worden vrij veel dieren aangevraagd voor het oefenen van de operaties. Is het noodzakelijk om beide operaties bij zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te oefenen? De dieren die een stereotactische operatie krijgen worden pas na twee weken gedood. Is het mogelijk om de tweede (terminale) operatie ook op deze dieren te oefenen?

Antwoord: *Brain structures between male and female are different, for example, nucleus of the preoptic area is three to eight times larger in male rats compared to female rats (Swaab 1995). The thickness of cerebral cortex is different between male and female rats (<http://education.jhu.edu/PD/newhorizons/Neurosciences/articles/Male%20and%20Female%20Brains/>). The differences can disturb the parameters of injection site and injection volume of virus. So the location of stereotactic injection should be modified base on the pilot study in both females and males.*

Yes we can. But it is really easy to become unskilled when there is a time gap between the practice and the actual experiment. In experiment 1a, we will first do the intravenous catheterization, so we have to practice this surgery first while the stereotactic surgery is not needed at this stage yet. If we would combine the two surgeries, and it is time for experiment 1c or 1d, the researchers may have become unskilled because there was too much time in between the training and the actual experiment. Losses will be greater of the actual experiment fails because of this.

-D : De onderzoekers hebben geantwoord dat het gedeeltelijk schoonmaken van de kooien ook wordt toegepast bij de dieren uit project 2015-0021. De commissie kan de beschrijving van deze werkwijze voor het gedeeltelijk verschonen van de kooien niet terugvinden in de beschrijving van project 2015-0021 en de bijbehorende werkprotocollen. Zij verzoekt de onderzoekers daarom dit uit de aanvraag te verwijderen.

Antwoord: We also could not find it back in the accepted version, but in a previous version. We apologize for the incorrect reference. Nonetheless, we thought it would be an elegant way to reduce the stress for the animals; stress may interfere with the depression and self-administration sessions, especially because the latter takes place daily. It is not necessary that caretakers do the cage cleaning, researchers can do as well, when it is better for their experiments. We have removed this method now from the proposal. We have no alternative.

-I: De individuele huisvesting ontbreekt nog in de opsomming van ongerief.

Antwoord: We have added this information.

-I3: De dieren kunnen toch juist niet sociaal gehuisvest worden vanwege de canule?

Antwoord: It is essential to socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social isolation starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional. Otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment. Also, the animals may harm each other, they can pull off each other's catheter or cannulas with dental cement. That is really painful and leads to bleeding/wounds. The suffering of the social isolation is clearly less than wounds that the animals may get by social interactions that go wrong.

-K: De commissie heeft gevraagd hoe lang de individuele huisvesting duurt, maar heeft nog geen antwoord hierop gekregen.

Antwoord: Please see our answer to comment I3: we socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social isolation starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional. Otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment. The whole experiment takes between 66-90 days. We cannot be very precise, because the duration is dependent on the performance of the animals. If it takes longer for animals to learn the behavioural tests, we will give them more time. We can only determine that during the experiment. We will not switch animals to a next stage because of the time, but only if they perform as required. If we use time as criterion we may lose animals. Behaviour is namely not like maths, it cannot be fully predicted.

-K: Is het ongerief voor de dieren in de pilot groep die een stereotactische operatie ondergaan en nog enkele weken gevolgd worden juist ingeschat?

Antwoord: We have changed the suffering to moderate and terminal according to the EU-directive 2010/63/EU.

Niet-technische samenvatting

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: We have made the appropriate changes.

References

Keramati, M., A. Durand, P. Girardeau, B. Gutkin and S. H. Ahmed (2017). "Cocaine Addiction as a Homeostatic Reinforcement Learning Disorder." Psychol Rev.

Swaab, D. F. (1995). "Development of the human hypothalamus." Neurochem Res 20(5): 509-519.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

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. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, na vragen van de commissie, besloten om het deel van de aanvraag dat als prematuur werd beoordeeld op een later tijdstip in een aparte aanvraag te verwerken. De DEC is er 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.
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 korte termijn doel van het project is te onderzoeken welke rol de laterale habenula speelt in de comorbiditeit van drugsverslaving en depressie in ratten met een genetische aanleg voor zowel verslaving als depressie. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De aanvragers zullen door de voorgestelde experimenten fundamentele kennis vergaren bij ratten over het cocaïneverslavingsproces en daarbij optredende verschijnselen van depressie, en het wordt duidelijk welke hersengebieden en neuronen daarbij betrokken zijn. Die kennis is van groot belang voor een beter begrip van verslaving en preventie of behandeling daarvan. De DEC is van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het korte termijn doel en het uiteindelijke doel, maar het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. 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 onderzoeksmogelijkheden. Carrière mogelijkheden en welstand kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen 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). Er dient tenminste (ook) sprake te zijn van een algemeen of publiek belang, wil een dierproef gerechtvaardigd zijn.

Voor patiënten/de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang. De huidige behandelingen van depressie en van verslaving zijn in veel gevallen niet succesvol. Een combinatie van depressie en verslaving is nog moeilijker te behandelen. Wanneer er een effectieve behandeling gevonden wordt voor de combinatie van depressie en verslaving, dan kunnen deze mensen weer beter functioneren en hebben zij een betere kwaliteit van leven. Uiteindelijk zouden de verworven inzichten kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van zo'n behandeling. Vermindering van de verslavingsproblematiek is van groot belang voor de samenleving.
6. De onderzoekers maken gebruik van genetisch gemodificeerde virale vectoren en transgene dieren waarbij zij de nationale GGO-regels in acht nemen. Hierdoor is er geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd, ondermeer doordat de operaties geoefend worden voordat ze in het kader van het experiment worden uitgevoerd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvragers, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken 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. Om de wisselwerking tussen depressie en het verslavingsproces te onderzoeken is het noodzakelijk het onderzoek uit te voeren met ratten die worden blootgesteld aan verschillende cocaïne zelftoedieningsregimes.

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 wordt hoofdzakelijk bepaald door de benodigde operaties, de (kortdurende) onthouding van cocaïne, de langdurige individuele huisvesting, en de gedragstesten. De combinatie van alle handelingen leidt tot terminaal ongerief voor 2% van de dieren, matig ongerief voor 51% van de dieren en ernstig ongerief voor 47% van de dieren.
12. De uiterlijke integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van een intraveneuze canule waardoor de dieren zichzelf cocaïne kunnen toedienen. Ook het induceren van een cocaïneverslaving kan worden beschouwd als een aantasting van hun integriteit, omdat ze voor hun welzijn afhankelijk worden van cocaïne. Het normale gedrag van de dieren verandert hierdoor.
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 eerdere ervaringen met (stereotactische) operaties 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. In dit onderzoek worden metingen in bepaalde hersengebieden gekoppeld aan complex (depressief) gedrag. Het gedragsrepertoire van de rat is voldoende uitgebreid om dit te kunnen meten. Minder complexe diersoorten zijn hiervoor niet geschikt.
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. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolgexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De aanvrager zal de vraagstelling zowel in mannelijke als in vrouwelijke dieren apart onderzoeken, omdat nog niet bekend is of de comorbiditeit van verslaving en depressie vooral in één van beide geslachten optreedt. Vanwege de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke hersenen zullen de operaties ook op beide geslachten worden geoefend.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De onderzoekers passen anesthesie en pijnbestrijding toe voor de handelingen waarvoor dit vereist is. Ter voorbereiding op de beoogde gedragstest worden voetschokken gegeven, maar de dieren leren om deze actief te vermijden. Voor de dieren die een genetische aanleg voor depressie hebben zal het ongerief oplopen tot ernstig, ondermeer omdat zij naar verwachting niet goed zijn in het leren vermijden van de voetschokken. 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. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om de hersenen 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 terminale, matige of ernstige 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 er alles aan om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun (geestelijke) gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Verslaving en depressie hebben een grote impact op zowel de patiënten als hun directe omgeving en de maatschappij. Een groot deel van de drugsverslaafden is ook depressief, waardoor het nog lastiger is hen te behandelen. Op dit moment is er nog geen medicamenteuze therapie voor cocaïneverslaving. De resultaten van dit project zullen bijdragen

aan meer kennis over de interactie tussen het verslavingsproces en depressie bij ratten en de hersengebieden en neuronen die daarbij betrokken zijn. Op de lange termijn kunnen deze resultaten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De commissie acht dit van groot belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken welke rol de laterale habenula speelt in de comorbiditeit van drugsverslaving en depressie in ratten met een genetische aanleg voor zowel verslaving als depressie. Het uiteindelijke doel daarvan is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de maatschappij 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. Voor de dieren die een genetische aanleg voor depressie hebben kan het ongerief oplopen tot ernstig. Dit onderzoek richt zich juist op de combinatie van depressie en verslaving, waardoor het onderzoek niet alleen uitgevoerd kan worden met dieren die geen last hebben van depressieve verschijnselen. De commissie is daarom van mening dat de doelstelling van het onderzoek niet behaald kan worden zonder deze dieren. De aard van het klinische en het maatschappelijke probleem rechtvaardigen het ernstig ongerief voor deze dieren. 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

- X 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

[Redacted address line]

Postbus 9101,
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002017872
Bijlagen
1

Datum 14 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 17 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" met aanvraagnummer AVD103002017872. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over de humane eindpunten beantwoord.

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 "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 februari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 9 maart 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft de vraag van de CCD over de huisvesting van de dieren beantwoord.

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

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Datum:
14 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
14 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

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, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022, voor het project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" met aanvraagnummer AVD103002017872, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 februari 2017, ontvangen op 17 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Behaviour and tracing				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	1.140	2% Terminal 47% Ernstig 51% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
AVD103002017872

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 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:
AVD103002017872

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:
AVD103002017872

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.