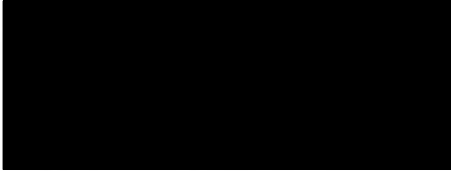




## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 2800028 (10 ct/min)  
wob-ccd@rvo.nl


**Onze referentie**  
B.2.17.003

**Uw referentie**  
2017/003

**Briefkenmerk**  
CCD-2018-137

**Bijlage(n)**

Datum **01 NOV 2018**  
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.17.003 (W16-18S)

Geachte 

Bij brief van 12 januari 2017, ontvangen op 13 januari 2017, heeft u, namens uw cliënte  een bezwaarschrift (met kenmerk 2017/003) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 8 december 2016 met kenmerk W16-18S. Op 7 augustus 2017 ontvingen wij uw aanvullende gronden van bezwaar.

### Verloop van de procedure

- Op 6 juli 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een achttal verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het betreffende verzoek;
- Bij besluit van 8 december 2016 hebben wij op dit Wob-verzoek beslist;
- Vervolgens ontvingen wij op 13 januari 2017 uw bezwaarschrift, gericht tegen voornoemd besluit;
- De ontvangst van uw bezwaarschrift hebben wij bij brief van 24 januari 2017 bevestigd;
- Op 24 januari 2017 is het Wob-besluit tezamen met de bijbehorende documenten op de website van de CCD geplaatst;
- Middels de brief van 21 februari 2017 hebben wij de termijn om te beslissen op uw bezwaarschrift met zes weken verdaagd;
- Per e-mail van 19 juli 2017 hebben wij aangekondigd dat wij in de onderhavige zaak met u een hoorzitting wilden plannen. Voorts hebben wij u in deze e-mail verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van Wob-besluit W16-18S sinds 24 januari 2017 op de website van de CCD staan gepubliceerd. Wij hebben u voor de

eventuele aanvulling van de gronden een termijn tot 28 augustus 2017 verleend. Tevens hebben wij u de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden toegestuurd;

- Naar aanleiding van de door u aangegeven verhinderdata hebben wij u bij brief van 1 augustus 2017 uitgenodigd voor de hoorzitting;
- Op 7 augustus 2017 ontvingen wij de aanvullende gronden van bezwaar;
- Vervolgens heeft op 21 september 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting hebben wij u op 19 oktober 2017 per e-mail toegezonden;
- Een derde belanghebbende heeft aangegeven gehoord te willen worden in deze zaak. De CCD heeft toepassing gegeven aan artikel 7:6 lid 2 van de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) en de belanghebbende afzonderlijk gehoord. Tijdens de hoorzitting zijn concurrentiegevoelige gegevens besproken, die voor geheimhouding in aanmerking komen. De telefonische hoorzitting heeft op 25 september 2017 plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting hebben wij u op 19 oktober 2017 per e-mail toegezonden, waardoor toepassing is gegeven aan artikel 7:6 lid 3 van de Awb;
- Overige derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

### **Beslissing**

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond en gedeeltelijk ongegrond. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

### **Ten aanzien van de ontvankelijkheid**

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 8 december 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Awb gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

### **Derde belanghebbenden**

Aan de derde belanghebbenden is gevraagd om gehoord te willen worden. Eén derde belanghebbende heeft hiervan gebruik gemaakt en het verslag van de hoorzitting hebben wij u reeds toegezonden (zie hierboven). Voor het overige zijn de zienswijzen van de derde belanghebbenden uit de primaire fase u vóór de hoorzitting, anoniem, maar verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

### **Bezwaren**

Hieronder worden uw bezwaargronden toegelicht.

Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn



gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme. Bovendien hebben betrokkenen volgens u op geen enkele wijze inzichtelijk gemaakt dat zij in de afgelopen jaren zijn geconfronteerd met ontoelaatbare bejegeningen van (dierenrechten)activisten. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u deze grond verder aangevuld (hierna: **bezwaar 4**).

U geeft aan dat gegevens op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zijn geweigerd, maar dat vergunninghouders in hun zienswijzen niet aannemelijk hebben gemaakt dat zij zijn geconfronteerd met incidenten. Deze bezwaargrond hangt samen met **bezwaar 4** en zal in dit gedeelte worden behandeld.

Voor wat betreft de vergunningen 2016481, 2016482 en 2016489 heeft u aangegeven dat uit het besluit niet volgt of literatuurverwijzingen naar nog niet gepubliceerde documenten zijn geweigerd. Bovendien is volgens u onduidelijk hoe een literatuurverwijzing naar een niet gepubliceerd document leidt tot identificatie. U bestrijdt niet dat namen van auteurs geweigerd kunnen worden. In het aanvullend bezwaar heeft u aangegeven dat in de vergunningen 2016481 en 2016482 ten onrechte verschillende passages zijn geweigerd. Dit geldt tevens voor vergunning 2016489, waarbij u heeft aangegeven dat het nabootsen van onderzoek niet leidt tot benadeling (hierna: **bezwaar 5**).

Aangaande vergunning 2016489 heeft u aangegeven dat ten onrechte informatie wordt geweigerd, omdat concurrerende onderzoekers het onderzoek zouden kunnen inhalen en nabootsen. Dit is volgens u een te onzekere toekomstige gebeurtenis. Ook de leeftijd van proefdieren en uit te voeren taken zijn volgens u ten onrechte geweigerd (hierna: **bezwaar 6**).

Voorts heeft u aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook bent u van mening dat het nog niet aanvragen van patent niet kan leiden tot weigering van openbaarmaking. Tevens heeft u aangegeven dat onderzoeksstrategieën niet patentwaardig zijn (hierna: **bezwaar 7**).

U bestrijdt verder dat openbaarmaking van de naam van een partij die betrokken is bij de financiering van een onderzoek leidt tot concurrentievoordeel voor andere onderzoekers (hierna: **bezwaar 8**).

In het aanvullend bezwaarschrift heeft u aangegeven dat in de vergunningen 2016484, 2016485, 2016486 en 2016487 ten onrechte passages zijn geweigerd, omdat dit onderzoeksstrategieën zouden zijn die bij openbaarmaking niet meer kunnen worden beschermd door intellectuele eigendomsrechten. Volgens u blijkt uit niets dat betrokken onderzoekers bij openbaarmaking van deze informatie niet als eerste kunnen publiceren. Bovendien bestrijdt u dat alle geweigerde passages zicht geven op een geheim te houden onderzoeksstrategie (hierna: **bezwaar 9**).

Tot slot wordt door u verzocht om heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

### **Ten aanzien van bezwaar 1**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting van 21 september 2017 heeft u verduidelijkt dat het betrokken Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD (zoals volgt uit het op 19 oktober 2017 toegestuurde verslag van de hoorzitting). Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend is. Uit de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: de Afdeling) van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: *"Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer hun gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies. In dat kader beschermt deze bepaling ook de opvattingen van hen die van buiten in de sfeer van het interne beraad zijn betrokken."*

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid. Derhalve bevat het advies persoonlijke beleidsopvattingen. De feiten die in het document zijn opgenomen, zijn zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven, dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. De CCD verwijst hierbij naar de zeer recente uitspraken van de Afdeling van 10 oktober 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:3299) en 18 juli 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:2424). Hiervoor kan eveneens aansluiting worden gezocht bij eerder genoemde uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 en de uitspraak van de Afdeling van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942).

Tenslotte volgt uit deze uitspraak dat artikel 11 lid 1 van de Wob bestuursorganen gebiedt om geen informatie over persoonlijke beleidsopvattingen openbaar te maken uit documenten die ten behoeve van intern beraad zijn opgesteld en dit artikel laat geen ruimte voor een belangenafweging.



Uit de uitspraak van de Afdeling van 28 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3478) volgt voorts dat het bestuursorgaan dat verantwoordelijk is voor de betrokken bestuursvoering bevoegd is om, los van de bereidheid van betrokkenen om in te stemmen met openbaarmaking, de informatie niet te verschaffen (*Kamerstukken II* 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 38). Zoals de Afdeling eerder heeft overwogen (in de uitspraak van 3 juni 2009, ECLI:NL:RVS:2009:BI6049) kan de kring van betrokkenen een rol spelen bij de beantwoording van de vraag of een geanonimiseerde versie van de persoonlijke beleidsopvattingen kan worden verstrekt.

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD – [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) – staan gepubliceerd. Door de zoekterm 'verslag' in te voeren, zijn deze verslagen eenvoudig te achterhalen. Uit de verslagen volgt wanneer welke aanvraag – onder vermelding van het NTS-nummer – in de vergadering is besproken. Uit de verslagen volgt dat de met dit Wob-verzoek opgevraagde documenten zijn besproken in de vergaderingen van 22 april 2016 en 13 mei 2016. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

Uit het bestreden besluit volgt niet dat wij voornoemde informatie hebben geweigerd, vanwege de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen. Wij kunnen u derhalve niet volgen in uw redenering.

### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Bij het bestreden besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob-verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) is (zijn) toegepast. Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder mee de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016 (ECLI:NL:RBAMS:2016:9336).

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling (artikel 10 lid 2 sub g van de Wob). Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het

advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD volledig is geweigerd op grond van artikel 11 van de Wob.

Het is dus zonder meer duidelijk op basis van welke uitzonderingsgrond is geweigerd een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning nagenoeg vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond zou leiden tot herhaling, hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 2 september 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:2779).

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld en in bepaalde – hieronder genoemde – gevallen leidt dit tot verdergaande openbaarmaking.

U heeft aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt.

Hierna wordt per vergunning – indien informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob en het geen namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen betreft of indien hierover twijfel bestaat – het oordeel van de CCD weergegeven over het weigeren van de betreffende informatie.

In vergunning 2016481 is niet langer informatie op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob geweigerd, zoals volgt onder **bezwaar 5**.

In vergunning 2016482 is informatie op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob geweigerd, echter is hierop onder **bezwaar 5** nader ingegaan. Voor de motivering verwijzen wij u naar dat onderdeel van het besluit.

In vergunning 2016483 is geen informatie op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob geweigerd.

De vergunningen 2016484 en 2016485 – welke samenhangen – bevatten in verschillende documenten informatie die is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Uit het bestreden besluit volgt dat de vergunninghouder heeft verzocht om weigering van bepaalde onderzoeksstrategieën, omdat deze bij openbaarmaking niet meer beschermd kunnen worden door intellectuele eigendomsrechten. De geweigerde informatie blijft ook middels dit besluit geweigerd, waarbij de onderbouwing met het onderstaande wordt aangevuld.

De CCD is van oordeel dat de onderzoeksstrategie per definitie inzicht geeft in de fase van het onderzoek en dat dit een reden kan zijn om bepaalde informatie te



weigeren. Verder omvat de geweigerde informatie essentiële informatie over de onderzoeksdoelstelling, de onderzoeksopties en de onderzoeksstrategie. In vergunning 2016485 wordt onderzoek uitgevoerd, waarin unieke combinaties van modellen en experimenten worden toegepast, welke een voorsprong kunnen geven in het kader van onderzoek en research en development. De CCD verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

Daarnaast dienen ook belangrijke te nemen stappen en subdoelen geweigerd te blijven, omdat deze tekenend zijn voor het verdere verloop van het onderzoek. Deze vergunningen hebben een looptijd tot en met 2021, waardoor de onderzoeken zich nog altijd in de beginfase bevinden en het nog altijd mogelijk is voor concurrenten om hetzelfde of zeer vergelijkbaar onderzoek uit te voeren. Te verwachten effecten en uitkomsten worden beschreven en de CCD is met de vergunninghouder van oordeel dat het niet wenselijk is wanneer deze informatie reeds voor de afhandeling van de onderzoeken wordt geopenbaard. Hierbij kan verwezen worden naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4555).

In vergunning 2016486 is middels het primaire besluit slechts in het projectvoorstel en de 'oude' bijlage beschrijving dierproeven (document 2 en 3) beperkt informatie geweigerd, vanwege het zijn van concurrentiegevoelige informatie. Door middel van dit besluit worden in de 'oude' bijlage beschrijving dierproeven de twee geweigerde woorden alsnog geopenbaard, omdat geen sprake (meer) is van concurrentiegevoelige informatie. In de 'nieuwe' bijlage beschrijving dierproeven (document 9) is in het geheel geen concurrentiegevoelige informatie geweigerd.

Deze vergunning had weliswaar een looptijd tot 2017, waardoor het onderzoek inmiddels is afgerond, maar aannemelijk is dat de geweigerde informatie in het projectvoorstel (document 2) bruikbaar is voor toekomstige onderzoeken en om die reden blijft deze informatie geweigerd.

In vergunning 2016487 is slechts in de documenten 2 en 12 (het 'oude' en 'nieuwe' projectvoorstel) informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Voor een gedeelte betreft dit referenties naar eigen onderzoekers, welke in verband met eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en het voorkomen van onevenredige benadeling geweigerd dienen te blijven. Daarnaast betreft het informatie uit of verwijzingen naar nog niet gepubliceerd (eigen) onderzoek.

Voor het overige betreft het concurrentiegevoelige gegevens, welke geweigerd dienen te blijven. Nu de weigeringen in deze twee documenten identiek zijn, geldt de navolgende onderbouwing voor beide documenten. Uit het verloop van de tekst volgt dat slechts de specifieke aspecten waar het onderzoek zich op richt, zijn geweigerd. Daarnaast is de keuze van medicamenteuze middelen die getest gaan worden afhankelijk van een aantal factoren en die kunnen in drie subdomeinen (ziekteprocessen) worden ingedeeld. Aangezien deze ziekteprocessen nog onderzocht moeten worden, dient deze informatie niet reeds in deze fase van het onderzoek geopenbaard te worden. Aannemelijk is dat concurrenten deze

specifieke informatie kunnen gebruiken voor eigen (vergelijkbaar) onderzoek. Op basis van het voorgaande blijft deze informatie middels dit besluit geweigerd. Voor wat betreft vergunning 2016489 is in verschillende documenten informatie geweigerd, omdat het concurrentiegevoelige informatie betreft. Zoals uit het door u bestreden besluit volgt, is een bepaalde stofnaam – welke kenmerkend is voor dit onderzoek – geweigerd. Daarnaast zijn ook de leeftijd van de dieren op bepaalde meetmomenten en de taken (handelingen) die moeten worden uitgevoerd, geweigerd.

In het bestreden besluit wordt 'gesproken' over een bepaalde stofnaam, echter is middel een meer juiste benaming. Het betreffende middel is in Nederland niet te koop en wordt binnen Nederland nog niet gebruikt voor onderzoek. Wanneer het middel effectief blijkt, wordt het in Nederland op de markt gebracht. Ook de samenstelling van het middel is in de documenten geweigerd, evenals de dosis en het tijdschema tijdens het onderzoek. Deze informatie leent zich bij uitstek voor het overnemen door concurrerende instanties. Van belang is hierbij eveneens dat het onderzoek – ten tijde van het primaire besluit – enige tijd heeft stilgelegen, waardoor openbaarmaking van de gegevens concurrenten de mogelijkheid zou hebben gegeven een inhaalslag te maken.

De leeftijd van de dieren is geweigerd, omdat de betreffende leeftijd specifiek is voor het onderzoek. Gebleken is dat het, het meest effectief is om de proefdieren vanaf de betreffende leeftijd te gebruiken. Ook de taken (handelingen) die binnen het onderzoek worden uitgevoerd, zijn middels het bestreden besluit geweigerd, omdat deze specifiek en kenmerkend zijn voor de betreffende onderzoeksgroep. Daarnaast zijn enkele onderzoeksgebieden niet geopenbaard, omdat een bepaalde link tussen deze gebieden wordt onderzocht, wat nog niet eerder is gebeurd. Tenslotte zijn vier passages geweigerd, omdat het nog niet gepubliceerde informatie betreft (dit volgt uit de tekst, waar bijvoorbeeld 'unpublished data' staat). Op basis van het voorgaande komt de CCD tot de conclusie dat sprake is van concurrentiegevoelige informatie, welke terecht is geweigerd. Het bestreden besluit wordt met voornoemde motivering aangevuld.

Voor de overige weigeringen in deze vergunning wordt verwezen naar hetgeen onder bezwaargrond 5 is aangegeven met betrekking tot literatuurverwijzingen.

#### **Ten aanzien van bezwaar 4**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

In dit kader zoekt de CCD aansluiting bij de uitspraak van de Afdeling van 31 januari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:321). Uit deze uitspraak volgt dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zich verzet tegen openbaarmaking van namen van medewerkers die niet wegens hun functie in de openbaarheid treden, tenzij de indiener van het Wob-verzoek aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt.

Voor de CCD staat voldoende vast dat op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarheid in dit concrete geval zwaarder weegt. De CCD is van oordeel dat de aangehaalde uitspraak van toepassing is op zowel





de namen van medewerkers van het secretariaat van de CCD als op namen van medewerkers van de vergunninghouders en/of de DEC's. Aangezien zowel in het bezwaarschrift als tijdens de hoorzitting op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarmaking zwaarder weegt dan het belang van het weigeren van deze informatie, ziet de CCD geen aanleiding om deze informatie (alsnog) te openbaren.

Ten aanzien van de dreiging van dierenrechtenactivisme wordt opgemerkt dat ook om deze reden de betreffende informatie geweigerd blijft. In het aanvullend bezwaarschrift en ook in andere aanvullende bezwaarschriften (bijvoorbeeld met uw kenmerken 2016/036, 2017/006 en 2017/029) heeft u deze bezwaargrond aangevuld en heeft u aangegeven dat de motivering van de Afdeling in de uitspraak van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) uitsluitend wordt gebaseerd op het feit dat onweersproken zou zijn gesteld dat betrokken vergunninghouders in de afgelopen jaren te maken hebben gehad met bedreigingen en intimidatie en dat de dreiging van dierenrechtenactivisme nog actueel is, de opmerking over een mogelijke heropleving van dierenrechtenextremisme in een rapportage van de NCTV en dat dierenrechtenextremisme nog wordt genoemd in het jaarverslag van de AIVD. Daarnaast heeft u aangegeven dat de vergunninghouders geen van allen zijn geconfronteerd met ontoelaatbare acties van dierenrechtenextremisten, dat de NCTV geen kennis heeft van recente acties van dierenrechtenextremisten en dat de AIVD kennelijk geen dreiging van dierenrechtenextremisme meer ziet.

Het bovenstaande is door u tevens aangevoerd in een hoger beroepsprocedure, welke uiteindelijk heeft geleid tot de uitspraak van de Afdeling van 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). In deze uitspraak verwijst de Afdeling naar de recente uitspraken van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), waarbij de Afdeling heeft overwogen dat de vrees voor dierenrechtenactivisme gerechtvaardigd is. De Afdeling ziet naar aanleiding van deze motivering geen aanleiding om thans tot een ander oordeel te komen. Het enkele feit dat in het jaarverslag van de AIVD over 2016 geen aparte signalering over dierenrechtenextremisme is opgenomen, is onvoldoende om thans tot een ander oordeel te komen dan in voormelde uitspraak.

Het voornoemde is nogmaals bevestigd in de zeer recente uitspraak van de Afdeling van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), waarbij aanvullend is aangegeven dat derde belanghebbenden geen concrete tot hen gerichte dreiging van dierenrechtenactivisme aannemelijk hoeven te maken. Ook uit de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766) volgt, dat vanwege de gerechtvaardigde vrees voor dreiging van dierenrechtenactivisme, het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

#### **Ten aanzien van bezwaar 5**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond deels. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld en in enkele gevallen leidt dit – zoals hieronder

genoemd – tot verdergaande openbaarmaking. Voor het overige blijven de weigeringen uit het primaire besluit in stand.

In het (aanvullend) bezwaarschrift heeft u allereerst aangegeven dat uit het besluit niet volgt of literatuurverwijzingen naar nog niet gepubliceerde documenten zijn geweigerd. Bovendien is volgens u onduidelijk hoe een literatuurverwijzing naar een niet gepubliceerd document leidt tot identificatie.

Tijdens de hoorzitting met de vergunninghouder behorend bij de vergunningen 2016481, 2016482 en 2016489 heeft de vergunninghouder bevestigd dat de referenties die zijn geweigerd, verwijzen naar bij de onderzoeken betrokken onderzoekers. Daarnaast gaat het in vergunning 2016489 ook om persoonsnamen die niet in een referentie staan vermeld.

Voor wat betreft vergunning 2016481 wordt middels dit besluit aanvullend informatie geopenbaard. Dit betreft enkele woorden in document 5 (blz. 82 van het geheel) en in document 9 (blz. 107 van het geheel). In document 5 blijft de naam van de onderzoeker echter wel geweigerd (blz. 82 van het geheel). De CCD is van oordeel dat deze naam terecht is geweigerd op basis van hetgeen in het bestreden besluit is aangegeven met betrekking tot het weigeren van namen en op basis van hetgeen onder **bezwaar 4** is aangevuld.

Aangaande vergunning 2016482 heeft u aangegeven dat in document 3 passages zijn geweigerd die geen persoons- of locatiegegevens of literatuurverwijzingen betreffen. In document 3 is op drie verschillende bladzijdes informatie geweigerd. Op twee pagina's (blz. 16 en 20 van het geheel) betreft het wel degelijk literatuurverwijzingen naar betrokken onderzoekers en deze gegevens blijven derhalve geweigerd. De andere weigering (op blz. 18 van het geheel) betreft een verwijzing naar de betrokken vergunninghouder en zal middels dit besluit worden geopenbaard. Ook in de vergunningen 2016481 en 2016489 worden verwijzingen naar de betrokken vergunninghouder alsnog geopenbaard.

In document 2 van vergunning 2016482 is de naam van een samenwerkingspartner geweigerd. In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen kan het eveneens voorkomen dat de naam wordt geweigerd van partners waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt. In dit kader verwijst de CCD naar de uitspraak van de Afdeling van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). De CCD is van oordeel dat in verband met de directe herleidbaarheid naar personen in dit geval de naam van de samenwerkingspartner dient te worden geweigerd.

Met betrekking tot vergunning 2016489 wordt middels dit besluit aanvullend informatie geopenbaard. Dit betreft enkele woorden in document 3 (pagina 23, 25, 37 en 44 van het geheel). Daarnaast heeft de betrokken vergunninghouder tijdens de hoorzitting aangegeven dat het bij de geweigerde namen en referenties gaat om namen van eigen, bij dit onderzoek betrokken onderzoekers. Ook met betrekking tot deze gegevens is de CCD van oordeel dat deze om voornoemde redenen geweigerd dienen te blijven.

Het is u onduidelijk hoe een literatuurverwijzing naar een niet gepubliceerd document leidt tot identificatie. De CCD is van oordeel dat het niet zozeer gaat om



de verwijzing, als wel om de namen van de betrokken onderzoekers die in de literatuurverwijzingen zijn opgenomen. Dit heeft u ook in uw bezwaarschrift opgenomen. De CCD is van oordeel dat namen van betrokken onderzoekers – om reeds eerder genoemde redenen – niet geopenbaard dienen te worden. Derhalve blijven deze verwijzingen ook middels dit besluit geweigerd. Hiermee wordt eveneens de zienswijze van de betrokken vergunninghouder gevolgd.

#### **Ten aanzien van bezwaar 6**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels.

In uw (aanvullend) bezwaarschrift heeft u aangegeven dat u bestrijdt dat met openbaarmaking van gegevens in vergunning 2016489 een derde het onderzoek kan nabootsen, de betrokken onderzoeker kan inhalen en mogelijk patent kan 'wegkapen'. Op geen enkele wijze wordt dit volgens u aannemelijk gemaakt. Het betreft volgens u een dermate onzekere toekomstige gebeurtenis dat zich niet laat rijmen met het uitgangspunt van de Wob.

U verwijst hierbij naar een uitspraak van de rechtbank Almelo van 10 januari 2007 (ECLI:NL:RBALM:2007:AZ5879). De CCD heeft echter eerder geoordeeld (bijvoorbeeld in beslissing op bezwaar B.2.17.001 van 7 augustus 2018) dat geen parallel wordt gezien tussen de betreffende uitspraak en de (geweigerde) informatie. Dit is door u niet weersproken. De CCD is van oordeel dat de aannemelijkheid voldoende is aangetoond.

Aangaande het tweede gedeelte van deze bezwaargrond (het weigeren van de leeftijd van de dieren en de taken die worden uitgevoerd) wordt verwezen naar de motivering onder bezwaargrond 3.

#### **Ten aanzien van bezwaar 7**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Voorts heeft u aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook het argument dat er nog patent moet worden aangevraagd, houdt volgens u geen stand. Tevens heeft u aangegeven dat onderzoeksstrategieën niet patentwaardig zijn.

Vooropgesteld zij dat de betreffende informatie (in de vergunningen 2016484, 2016485, 2016486 en 2016487) is geweigerd, omdat sprake is van concurrentiegevoelige informatie (zie onder bezwaar 3, waar hier nader op is ingegaan).

In veel gevallen is bescherming van de onderzoeksstrategie middels intellectueel eigendom nog niet mogelijk, nu dit onderzoek zich nog in de beginfase bevindt. De betreffende vergunningen 2016484, 2016485 en 2016487 hebben een looptijd tot en met 2021, waardoor dit onderzoek zich nog altijd in de beginfase bevindt. Het voornemen van de onderzoeker om patent aan te vragen, werkt signalerend voor het belang van het onderzoek en daarmee om de te weigeren informatie geweigerd te houden.

De CCD is van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, er dus nader onderzoek nodig is en er nog geen publicaties zijn geweest over het voorliggende onderzoek, het niet wenselijk is dat onder andere de strategie van de komende tijd al in deze fase wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na de dierproeven worden resultaten duidelijk en dus ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. Wanneer de betreffende informatie reeds nu wordt geopenbaard, is dit nadelig voor de onderzoeker, omdat het onderzoek dan gekopieerd kan worden en de mogelijkheid bestaat dat concurrenten eerder patent aanvragen.

De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd en dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers, als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige gegevens. De CCD verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 3 juli 2017 (ECLI:NL:RBGEL:2017:3427).

Voor wat betreft de looptijd van vergunning 2016486 wordt verwezen naar bezwaargrond 3, waar hier reeds nader op ingegaan is.

#### **Ten aanzien van bezwaar 8**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels.

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat u bestrijdt dat openbaarmaking van de naam van een partij die betrokken is bij de financiering van een onderzoek leidt tot concurrentievoordeel voor andere onderzoekers.

In het door u bestreden besluit is aangegeven dat de naam van de partij die betrokken is bij de financiering van het onderzoek niet openbaar gemaakt mag worden, omdat deze financiering het doel heeft om een research and development voorsprong te verkrijgen. Bij openbaarmaking van de naam van deze partij wordt het voor andere onderzoekers eenvoudiger om het onderzoek en de ontwikkeling in te halen of zelfs voorbij te gaan.

De CCD is thans van oordeel dat de zienswijze van de vergunninghouder in het bestreden besluit onjuist is geïnterpreteerd. Uit de zienswijze volgt dat financiering vanuit het bedrijfsleven als doel heeft een research and development voorsprong te krijgen. Wanneer de onderzoeksstrategie echter bekend wordt, is dit schadelijk voor zowel de onderzoeker als de concurrentiepositie van het betrokken bedrijf. Dit betekent echter niet dat bij openbaarmaking van de naam van de financier het voor andere onderzoekers eenvoudiger wordt om het onderzoek in te halen.

Desalniettemin blijft de naam van de partij die betrokken is bij de financiering van het onderzoek geweigerd, vanwege de vrees voor dierenrechtenactivisme. In dit kader wordt verwezen naar de uitspraak van de Afdeling van 7 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). Indien er sprake is van een reëel risico van dierenrechtenactivisme bij openbaarmaking van de naam van deze onderneming dan is de CCD van oordeel dat het belang van openbaarmaking niet opweegt tegen de onevenredige benadeling die dit met zich zou meebrengen. Dat er nog



altijd een reëel risico bestaat, volgt uit hetgeen onder bezwaargrond 4 is weergegeven.

### **Ten aanzien van bezwaar 9**

In het aanvullend bezwaarschrift heeft u aangegeven dat in de vergunningen 2016484, 2016485, 2016486 en 2016487 ten onrechte passages zijn geweigerd.

Voor wat betreft deze vergunningen is reeds onder bezwaargrond 3 en 7 uiteengezet om welke redenen de verschillende passages zijn geweigerd. Voor de onderbouwing wordt naar deze onderdelen verwezen.

Voor wat betreft vergunning 2016485 document 5 heeft u aangegeven dat een vraag van de DEC, de datum waarop het antwoord is gekomen en het antwoord zijn geweigerd. Ook is volgens u een passage waarin de DEC een oordeel geeft over vermindering van het aantal dierproeven en een passage over de ethische afweging ten onrechte geweigerd.

De CCD kan uw oordeel, dat in document 5 de datum van antwoord en het antwoord zijn geweigerd, niet volgen. De datum is namelijk in dezelfde alinea nog geopenbaard en het antwoord is verwerkt in het projectvoorstel en de bijlage(n). De betreffende vraag bevat concurrentiegevoelige informatie, welke ook in de documenten 2 en 3 (het projectvoorstel en de bijlage beschrijving dierproeven) is geweigerd. De onderbouwing van deze weigering volgt uit bezwaargrond 3 en 7.

Voorts heeft u aangegeven dat een passage waarin de DEC een oordeel geeft over vermindering van het aantal dierproeven is geweigerd. Weliswaar is een zinsdeel geweigerd van een gedeelte van het DEC-advies waarin vermindering wordt besproken, echter betreft dit niet het oordeel van de DEC over vermindering van het aantal dierproeven. Dit geldt eveneens voor hetgeen in het onderdeel 'ethische afweging' van het DEC-advies is geweigerd. Dit betreft de onderzoeksdoelen, welke eveneens in document 2 (het projectvoorstel) zijn geweigerd, vanwege concurrentiegevoelige informatie, zoals volgt uit hetgeen is onderbouwd onder bezwaargrond 3.

### **Verzoek proceskostenvergoeding**

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 1.002,- zijnde 1 punt á € 501,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 501,- voor de gehouden hoorzitting.

### **Wijze van openbaarmaking**

Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

### **Beroep**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijs ik u naar [www.rechtspraak.nl](http://www.rechtspraak.nl).

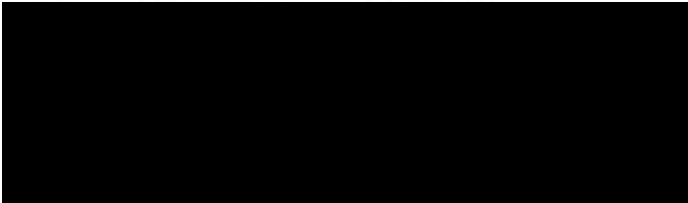
U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

### **Tot slot**

In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,



prof. dr. B.J. Blaauboer  
Waarnemend voorzitter



AVD 103002016 481

22 MAART 2016



1.

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Grooteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 6 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 6 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Unraveling the underlying mechanisms of depression
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderliggende mechanismen van stress gerelateerde aandoeningen zoals depressie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.584,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC advies en factuurinformatie

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 18 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]



### Form Project proposal

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

## 1 General information

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen         |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Unraveling the underlying mechanisms of depression |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research<br><input type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Currently, depression is thought to be caused by an interaction from the environment (stress) and (genetic) predispositions of the individual. Whilst the exact mechanism is not known, it is known that there is a higher risk of developing depression when more stressful life events have occurred (Brown & Harris, 1978, Nemeroff and Vale 2005). Numerous human and animal research show that adverse life events or stress are undoubtedly one of the major risk factors for the development of depression (McEwen 2003, De Kloet et al. 2005, Nemeroff and Vale 2005, Joëls and Baram 2009, Schmidt 2011, Morava and Kozicz 2013). A stressor is something that challenges the individual and is in conflict with the individual's homeostasis. It can be either external or internal, and physical or psychological (Chrousos and Gold 1992, McEwen 2003, De Kloet et al. 2005). In order to maintain homeostasis, the individual must challenge the stressor; one way to do this is by generating the so-called stress response. The best-known and characterized stress response system is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis. In this system, upon a challenge, corticotropin-releasing factor (CRF) is released, which via the pituitary gland activates the adrenal glands to release corticosteroids. The released mineralo- and glucocorticoids mediate various important physiological adaptive processes. These adaptive processes involve the recruitment of multiple brain areas and complex brain networks (De Kloet et al. 2005, Pittenger and Duman 2008, Joëls and Baram 2009, Price and Drevets 2012, McEwen et al. 2015). Depending on the stressor, different parts of these networks are recruited that will coordinate different physiological, neuroendocrine, and behavioral aspects of the stress response (Joëls and Baram 2009, Krishnan and Nestler 2010, Morava and Kozicz 2013). If one or more of the stress responsive systems are not functioning properly, the different physiological processes to adequately cope with the stressor cannot be activated properly and the stressor cannot be handled in an adaptive manner increasing the risk to develop depression (McEwen 1998, Brown et al. 2004, De Kloet et al. 2005, Joëls and Baram 2009, Krishnan and Nestler 2010). For example, for over more than two decades it has been known that there is a direct relationship between depression and alterations in the HPA-axis and the CRF system (Nemeroff et al. 1984, Banki et al. 1987, Raadsheer et al. 1994, Bale and Vale 2004, Merali et al. 2004, De Kloet et al. 2005, Pariante and Lightman 2008).

One of the best-known hypotheses for the underlying cause of depression is the monoamine hypothesis. This hypothesis states that a decrease in monoamines, such as serotonin or dopamine, in the synaptic cleft together with environmental factors, such as stress, can be an underlying cause of depression. Most antidepressant medications are based on this theory, and increase the amount of monoamines in the synaptic cleft. Unfortunately, antidepressant treatment alleviates symptoms of depression only after several weeks of medication in only a subset (~50%) of the patient

population (Berton and Nestler, 2006), indicating that there are also other mechanisms involved in the pathology of depression. To develop new therapeutic targets for depression, new concepts and hypothesis are needed described below.

## **The peptidergic hypothesis**

### *Urocortin 1*

One of such new hypothesis that focusses on the mechanisms underlying the stress response adaptation is the peptidergic hypothesis. This hypothesis postulates that if there is an imbalance in peptides involved in initiating and maintaining the stress response, it could lead to increased susceptibility to stress-related disorders. For over two decades, the HPA-axis, involving the neuropeptide CRF, has been considered the main system for controlling the stress adaptation. However, the identification of two CRF receptors (CRF-R1 and CRF-R2) with distinct ligand binding properties, added a new dimension to our view on stress adaptation. Moreover, the discovery of new members of the CRF neuropeptide family, urocortin 1 (Ucn1), urocortin 2 (or stresscopin-related peptide), and urocortin 3 (or stresscopin) has provided important insights into stress adaptation pathways and suggests that stress adaptation involves more systems than the HPA-axis alone (Steckler and Holsboer 1999, Bale and Vale 2004, Joëls and Baram 2009, Vaughan et al., 1995, Hsu and Hsueh, 2001, Lewis et al., 2001, Reyes et al., 2001, Janssen and Kozicz, 2013). Ucn1 is most abundantly expressed in the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (EWcp) (Kozicz et al., 1998; Bittencourt et al., 1999). It has been shown that Ucn 1 is involved in different behaviors such as the suppression of food and water intake (Spina et al. 1996, Jones et al. 1998, Smagin et al. 1998, Coste et al. 2000, Skelton et al. 2000), alcohol drinking (Ryabinin et al. 2012), social behavior (Sajdyk et al. 1999, Skelton et al. 2000) as well as in the stress response, depression, and anxiety (Moreau et al. 1997, Jones et al. 1998, Skelton et al. 2000, Gaszner et al. 2004, Kozicz 2007, Rotzinger et al. 2010, Kormos and Gaszner 2013). Furthermore, in humans it has been found that UCN1 mRNA is up-regulated in brain samples of male, but not female, suicide victims compared to non-depressed controls (Kozicz et al. 2008, Kormos and Gaszner 2013). In addition, these Ucn1 neurons are recruited by various acute stressors and their messenger RNA expression is up-regulated by acute pain and restraint stress (Kozicz et al., 2001; Cunha et al., 2007; Spencer et al., 2012). Our recent data and research by others indicate that an important role in stress adaptation is played by Ucn1 from the EWcp (Gaszner et al., 2004; Korosi et al., 2005; Cunha et al., 2007; Kozicz, 2007).

### *Orexin*

Another family of peptides that seems involved in the stress response are the orexins, also known as the hypocretins, consisting of orexin-A and orexin-B. These peptides are synthesized solely within the lateral hypothalamus and adjacent regions (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). They bind to two G-protein-coupled receptors, orexin receptor-1 (OXR-1) and orexin receptor-2 (OXR-2) (Sakurai et al., 1998). Several observations suggest that the orexins modulate behavioral state and state-dependent processes. For example, narcolepsy is associated with a decreased concentration of orexin in the cerebrospinal fluid, as well as the number of orexigenic neurons is reduced (Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Furthermore, intracerebroventricular administration of orexin-A or -B increases time spent awake as well as behaviors typical of spontaneous waking and/or stressful, high-arousal conditions, activate the HPA-axis, as well as activates CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala (Kuru et al., 2000; Al-Barazanji et al., 2001; Samson and Taylor 2001; Sakamoto et al., 2004). Orexins are also involved in feeding behavior, the reward system, and the stress response (Sakurai et al., 1998; Kunii et al., 1999). Most of these functions are disturbed in depressed patients, indicating that orexin may be involved in depression. Indeed, several studies found a dysregulation of the orexinergic system in depressed patients (Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). Also animal research supports the involvement of orexin in depression, different genetic animal models for depression (the Wistar-Kyoto and Flinders Sensitive Line rats) show differences in the orexin system compared to control animals (Allard et al. 2004, Mikrouli et al. 2011, Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). However, how precisely orexins are involved in the pathology of depression is unknown, as in both human and animal research hypoactivity as well as hyperactivity of the orexin signaling is associated with depression and depressive phenotype (Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). But with

aforementioned evidence it is reasonable to predict that the orexin system plays a role in depression pathology. In addition to this, various brainstem and basal forebrain regions that are implicated in the regulation of behavioral state of stress, including the locus coeruleus, the medial portion of the preoptic area, the paraventricular hypothalamic nucleus, and the EWcp, contain orexin-containing fibers and orexin receptors (Trivedi et al., 1998; Marcus et al., 2001; Peyron et al., 1998; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999). However, the exact mechanisms underlying the involvement of these peptides in behavioral and neuropsychological impairments that are observed in depression remain largely elusive.

### **MicroRNA hypothesis**

As described above, dysregulated or altered peptide expression seems to play an important role in the adaptive stress response and depression susceptibility. In recent years a new player as regulator of peptide expression has emerged, namely microRNAs (miRNAs). MiRNAs are small, 21-nucleotide-long units of noncoding RNA which regulate gene expression post-transcriptionally. A miRNA first binds to a miRNA Silencing Complex (miRISC) after which this complex binds to a specific seed region on the 3' untranslated region of an mRNA. As the complex is bound to the mRNA, the mRNA is either degraded, translation is silenced, or in rare cases stimulated. One miRNA can bind up to hundred different mRNAs and, in addition, each mRNA can contain seed regions for hundreds of different miRNAs. To date, miRNAs have been linked to various processes such as metabolism (Ambros et al, 2008), cellular development, and apoptosis (Magni et al, 2014). Furthermore, different miRNAs are also linked to different diseases such as cancer (DeSano & Xu, 2009), Celiac disease (Magni et al, 2014), viral infections (Timoneda et al, 2014), neurodegenerative diseases (Cogswell et al., 2008; Maciotta et al, 2013), as well as psychiatric and stress related disorders (Kocerha et al, 2015). MiRNAs are potential important players in the development of stress related disorders because of their overall abundance in the brain, the potential regulation of different neuropeptides involved in the stress response, or because of their role in the regulation of various metabolic processes. Our preliminary findings on miR-326 show that this miRNA can directly regulate the Ucn1 peptide. Furthermore, others also have shown different miRNAs targeting e.g. CRFR1, glucocorticoid, and corticosteroid signaling (Kocerha et al, 2015, Haramati et al, 2011), all key mediators of the stress response as described above. Studies done on post-mortem brain tissue from depressed patients have shown changed expression levels of several miRNAs which might play a role in depression, including higher levels miR-1202 (Lopez et al, 2014) and lower levels of miR-135 (Issler et al, 2014). An ongoing, comprehensive study done by our lab on the expression patterns of noncoding RNA in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), amygdala, and prefrontal cortex (Brodmann's area 25) of patients who suffered from depression and who eventually committed suicide, are showing several other interesting miRNAs including miR-34 and miR-127, which have been linked to stress-related anxiety (Haramati et al, 2011) and cocaine-induced plasticity (Chandrasekar & Deyer, 2011), respectively. As our experiment is ongoing, we will further functionally analyse these potential targets before we select several interesting ones for behavioural testing using the methods described in this project. This study should provide us with a list of microRNAs which are- and which aren't differentially expressed in highly stressed suicidal subjects as compared to a control condition. Whilst we are not sure yet which microRNAs will be tested, we will select those based on: a significant, consistent, differential expression in one or all of the brain areas involved, between the stressed- and non-stressed conditions ( $P < 0.05$ ; fold change of at least 1.2; preferentially a similar pattern of expression across brain areas); a similar gene expression of these microRNAs as measured by qPCR in human tissue of these stressed suicidal subjects; possibly similar differential protein expression as measured by luciferase vector assay, should we be able to select a strong regulatory target for the microRNA in question.

### **Suboptimal mitochondrial function hypothesis**

All of the aforementioned processes require a substantial amount of energy mobilization, e.g. the production and regulation of peptides and synaptic plasticity required for a proper stress response. These processes are relative energy expensive processes. If the required amount of energy cannot be mobilized because of genetic defects or because the organism is exhausted, peptide expression and/or synaptic plasticity could be dysregulated. This in turn can lead to an incomplete or failed response to adapt to the stressor, leading to maladaptation. In the brain, most of the energy is

produced by the mitochondria. When mitochondrial function is not adequate for normal daily activities, it causes mitochondrial disorders. Patients with mitochondrial disorder show a 54% lifetime prevalence for depression (Fattal et al. 2007). This is more than two times as high as the incidence in the normal population which is around 20% (Kessler et al., 2003). Also, other studies showed that patients with suboptimal mitochondrial function had a higher incidence for developing depression compared to controls (Suomalainen et al., 1992; Carrozzo et al., 2007; Morava et al., 2006a, b; Koene et al., 2009). This indicates that decreased mitochondrial functioning could be pathological in depression. Furthermore, depressed patients show a decreased mitochondrial functioning in peripheral blood cells (Karabatsiakos et al, 2014). Similar to the monoamine hypothesis, a genetic predisposition in the functioning of the mitochondria together with a stressor may cause the individual to fail to adequately adapt to the stressor and develop stress related disorders such as major depression or anxiety (Morava and Kozicz, 2013). These findings, together with aforementioned required energy mobilization for an adequate stress adaptation, have led to the hypothesis that suboptimal mitochondrial function is involved in the pathology of depression. When not enough energy can be produced because of a decreased mitochondrial functioning, successful adaptation is not achieved and maladaptation may occur that ultimately can lead to stress related disorders such as depression or anxiety. Preliminary findings on mice with decreased mitochondrial functioning show that these animals are more prone to develop depressive behavior when stressed. Also immunohistochemical analysis shows an altered activation of several brain regions involved in the stress adaptation. In order to study this hypothesis a new animal model with decreased mitochondrial function will be used. This animal has a decreased Ndufs4 protein, a subunit of complex I of the mitochondria, because of a gene trap insertion in an early locus of the gene.

As described above, all three hypotheses have an influence on the stress response as well as on depression susceptibility. However, it seems that they also interact with each other. For example, miRNAs have a direct influence on different proteins such as Ucn1 (Aschrafi et al. 2015). Also the different described proteins such as Ucn1 (Lawrence et al. 2004, Townsend et al. 2007, Davidson et al. 2009) and orexin (Sellayah et al. 2011) have a direct influence on the mitochondria. A dysregulation of these proteins could also have a direct influence on mitochondrial functioning. In this way miRNAs can also have an indirect influence on the mitochondria by regulating or dysregulating different proteins. However, it has also been found that different miRNAs have a direct effect on the mitochondria (Chan et al. 2009, Chen et al. 2010). If this is also the other way around, that the mitochondria have a direct effect on the described proteins or miRNAs is unclear, this will also be investigated in this project. It seems that these three hypotheses are tightly linked, however what the mechanisms are, what processes are upstream or downstream, and what their influence is on depression symptoms are, is unknown. This project will contribute to unraveling this.

In this project we will also investigate the fact that depression is not only one disease. Depression has many different symptoms (e.g. Criteria A in DSM V) where only 5 out of 9 symptoms are required for the diagnosis depression. The different symptoms are depressed mood or irritable, decreased interests or pleasure, significant weight change or change in appetite, change in sleep, change in activity, fatigue or loss of energy, guilt/worthlessness, concentration, and suicidality. The different animal models will not only be used because they have interacting mechanisms, but also because they can shed light on potential different mechanisms underlying different symptoms of depression. Because only 5 out of 9 symptoms must be present to diagnose depression, there are many different combinations possible resulting in the fact that not everyone have the same symptoms. This can point towards different mechanisms that we can potentially investigate with the different animal models. For example, this way we can investigate if orexin influences the change in weight, appetite or sleep as depression symptoms, or that the mitochondria are underlying the fatigue, loss of energy or a change of activity. Together with the three different stress models we try to elucidate the potential different underlying causes of depression that can explain the different symptoms with different people.

So, despite several decades of research the current knowledge and therapies for the treatment of depression are not yet sufficient. This is largely because the exact underlying mechanisms of depression are still largely unknown. In this project we will test several new hypothesis for underlying



causes of depression, namely the involvement of the peptides orexin and urocortin as well as microRNAs and suboptimal mitochondrial functioning. This will be done using readily available animal models, namely the orexin KO, Ucn1 KO, and Ndfs4 deficient animals, as well as with mice where a specific miRNA expression is altered. This project also utilizes three different kinds of stressors, namely chronic variable stress, chronic social defeat stress, and acute stress. These three stressors are necessary because it is known that physical and psychological stressor have other effects on different individuals and on underlying mechanisms (Lamb 1979, Briski and Gillen 2001, Kavushansky et al. 2009). The chronic variable stress focusses more on the physical and unpredictable component of the stressor while the social defeat stress focusses more on the psychological component of stress. To determine if the initial stress response is different between WTs and the different animal models in this project an acute stressor is used.

Lastly, an intervention study is utilized to test the influence of different antidepressants on depressive behavior in the stressor that gives the most robust effect in each animal model. This experiment will be done using two different classical antidepressants. These antidepressants will be chosen on for example their effect on the mitochondria. It is known that different antidepressants have a different effect on the mitochondria, some will have a positive effect whilst others have a negative effect on mitochondrial function. This intervention experiment will verify and potentially strengthen results found in first three stress experiments. Classical antidepressants are used because they are readily available and widely used, consequently if this research finds promising new results and uses for these classical antidepressants this could faster lead to more personalized health care.

With this project we aim to shed more light on potential underlying causes and mechanisms for depression. Hopefully with the acquired new insight in the aethiology of depression new and more effective treatments can be generated.

### 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?

This project aims to provide several important novel insights in the etiology and biological underpinnings of stress related disorders such as depression using various translational animal models. For example, the involvement of mitochondria in the susceptibility in depression, the involvement of certain microRNAs in the pathophysiology of stress related disorders, as well as the involvement of different peptides such as Ucn1, orexin, and CRF in the stress response and depression susceptibility. In addition to this, possible interactions between these different biological underpinnings will also be investigated as well as how much these could contribute to the pathology of various Category A depression symptoms (DSM V) like fatigue, sleep problems, psychomotor retardation, etc.. The use of novel hypotheses, as outlined in section 3.1, in combination with well-validated models for stress-related psychological diseases with the focus on depression, will help us better understand the underlying mechanisms of stress related psychiatric diseases as well as a better understanding of the various category A symptoms of depression. Consequently, it could also give new insights in identifying novel therapeutic targets and treatment strategies of major depression. In addition, important data will be acquired to better understand fundamental mechanisms contributing to stress adaptation, and consequently will increase our insight into neuronal processes that may underlie unsuccessful adaptation to stress and depression susceptibility. Ultimately, this may lead to the development of new treatment targets or the re-categorization of current treatments which is investigated in experiment 4. In order to investigate the interaction between the above detailed mechanisms in depression vulnerability, the various mechanisms mentioned in the background are

examined in parallel. We will be able to identify different behavioral, physiological, and endocrine aspects of depression that can be correlated/compared to similar parameters in humans giving this project a great translational value.

Similar experiments investigating stress-related disorders were already performed in the past in our lab including experiments with *Ndufs4*def, orexin KO, and *Ucn1* KO mice, giving us experience with these types of experiments. This allows us to work efficiently and with the least amount of distress for the animals. Also, because of this experience and the available knowledge, the main objectives should be achievable and realistic within the duration of the project. This project will be a continuation of the research that has already been performed in this lab towards unraveling the underlying mechanisms of depression. Previous experiments encompass miRNA 326 and *Ucn1* (Aschrafi et al. 2015), orexin and stress (Emmerzaal et al. 2013), *Ucn1* and depression (Kozicz 2007, Spencer et al. 2012), as well as mitochondrial function and depression (Emmerzaal et al. 2015).

---

### **3.3 Relevance**

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

---

It has been estimated that one in five individuals will develop depression in some point in life and in 2010 there were 298 million separate cases of depression recorded globally, with an average duration of 37.7 weeks (Ferrari et al, 2013). At that time depression was the second leading cause of burden of disease worldwide (Ferrari et al, 2013), whilst the World Health Organization (WHO) estimated that depression would be the leading cause of disease by the year 2020. At this moment the WHO reports that depression is the leading cause for disease with worldwide 350 million people suffering from depression of all ages. Depression not only has a profound effect on the individual but also on his/her family and society as a whole. Despite decades of research towards the pathogenic mechanisms behind depression, the neurobiology underlying this complex disorder remains largely elusive. A consequence is that treatment options at the moment remain poor, with up to 40% of patients not responding to current treatment methods (Fava, et al, 1996; Berton and Nestler, 2006; Saad Al-Harbi, 2012). Therefore, understanding the (neuronal) mechanisms underlying fundamental biological processes in adaptation to stressors are of great importance (as the link between stress adaptation and depression indicated in section 3.1). Despite several decades of research that have identified several possible underlying pathologies, progress in understanding depression, and related disorders overall, has been slow and the search for new therapeutic targets and approaches is necessary. In this context, fundamental animal research utilizing well-validated animal models of depression is therefore of great importance to reveal novel mechanisms of stress-related psychiatric diseases that can lead to novel treatment strategies.

---

### **3.4 Research Strategy**

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

---

The main objective of this project is to investigate underlying mechanisms that mediate the behavioral, endocrine and physiological alterations seen in depression, a stress-related disorder. In these experiments the different genes of interest and possible underlying mechanisms described in section 3.1 will be investigated using different animal models. These animals are bred for a specific genetic knockout/knockdown and therefore have a general change in expression of the gene of interest. In these experiments we will be using mice which lack orexin and *Ucn1*. We will also use an *Ndufs4* deficient mouse model to induce a decreased mitochondrial function in these animals. These animals are readily available in our lab. Furthermore, also two different miRNAs will be tested through either lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and

employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The specific miRNA will be chosen after a comprehensive investigation in suicide patients that is ongoing at this moment as described in section 3.1. Using these genetically modified animals, we will aim to investigate whether changes in the expression of these genes or miRNAs, coupled with different methods of stress induction influence depression susceptibility. To investigate depression susceptibility three different stress paradigms will be used, 1) a chronic variable stress paradigm, 2) chronic social defeat stress paradigm, and 3) an acute stress paradigm. 4) After these three experiments an intervention study with different antidepressants will be utilized with the stress model that gives the most robust findings in the animals.

The five different animal models (Ucn1 KO, orexin KO, Ndufs4def, altered miRNA mice) will be used in four different experiments. All these animal models will be used to study the following:

1) Investigate the effect of unpredictable chronic stress on depression susceptibility.

For this experiment the different animal models are subjected to a chronic variable stress paradigm and their depression susceptibility is determined via various behavioral tests and biochemical parameters.

The questions to be answered in this experiment are:

- Is depression susceptibility after a chronic variable stress paradigm influenced by altered peptide levels, mitochondrial function, or miRNA abundance?
- What are the specific effects of these altered parameters on the animals behavior after the stressor?
- What biochemical parameters underlie and influence the potential depression susceptibility?

2) Investigate the effect of social defeat stress on depression susceptibility.

For this experiment the different animal models are subjected to social defeat stress. This will be induced via a resident intruder paradigm.

Depression susceptibility is again determined via various behavioral tests and biochemical parameters.

The questions to be answered in this experiment are:

- Is depression susceptibility influenced by altered peptide levels, mitochondrial function, or miRNA abundance after social stress?
- Are other mechanisms involved in depression susceptibility after social stress as compared to chronic variable stress?

3) Investigating differences during the acute stress response as possible underlying causes for depression susceptibility.

In this experiment the different animal models will be challenged by an acute stressor to determine if the initial stress response is already altered in these animals.

This experiment addresses the following questions:

- Can the potential differences found during the chronic stressors be explained by a difference during the acute stress response?
- Are different acute stress parameters negatively altered in the different animal models?
- Is there a difference in neuronal network activation during the initial stress response?

4) The effect of different antidepressants on reducing depression susceptibility

In this experiment one of the three stressors will be used in an intervention experiment. The animals will be stressed while different groups of animals will receive different treatments. These different treatments are for example based on the effect at the mitochondria.

With this experiment we can address the following questions:

- Can the enhancement or decrease of mitochondrial function by antidepressants influence depression susceptibility?
- Are current antidepressants effective in the treatment of depressive behavior in these different animal models?

### 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.

---

First we plan to investigate the effects of different stressors on depression susceptibility in the different animal models as explained in the previous sections. We will use mice which lack the peptides Ucn1 and Orexin, as well as a new mouse model with decreased mitochondrial function because of a lower Ndufs4 expression. These animals are readily available and present in our lab. To investigate the influence of miRNA abundance we will use specifically engineered viral vectors that can be injected locally, to induce changes in microRNA abundance. To investigate depression susceptibility of these genetically modified animals they will be subjected to three different well validated stress paradigms; 1) chronic variable stress (Pittenger and Duman 2008, Hill et al. 2012, Franceschelli et al. 2014), 2) chronic social defeat stress through a resident intruder paradigm (Kudryavtseva, Bakshantovskaya, & Koryakina, 1991, Rygula et al. 2005), and 3) acute stress (Katz et al. 1981, Fullerton et al. 2004, Bogdan and Pizzagalli 2006).

1) The chronic variable stress model is based on the learned helplessness aspect of stress. The animal is not able to control or predict the stress it will face, due to its unpredictable- and chronic nature. The chronic stress will consist of a variable stress paradigm where for 21 consecutive days a stressor and/or a behavioral test will be presented to the animals. These stressors will be presented in a randomized order where each stressor is presented an equal number of times. The duration of the stressor can be between one hour and an overnight time period. All animals in the stressed group will receive the same stressors.

2) The social defeat stress model is based on stress originating from the experience of aggression and submission. This will be done via a social defeat paradigm. Previous research has shown social defeat stress to be a viable animal model for depression, that induces a depressive phenotype (Kudryavtseva, Bakshantovskaya, & Koryakina, 1991; Rygula et al., 2005) and an enduring activation of the HPA axis (Covington & Miczek, 2005; Koolhaas, De Boer, De Rutter, Meerlo, & Sgoifo, 1997).

3) Acute stress will be used to study changes in the initial phase of the stress response that could eventually lead to a depressive phenotype. The stressor can be for example a series of electric foot shocks, restraint, lipopolysaccharide (LPS) injection, or forced swimming.

After each of the aforementioned stress procedures several well validated behavioral tests will be performed in order to investigate normal- and depression-like behavior. Behavioral tests that will be used are for example the Porsolt swim test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, and grip test. In addition to these tests, the animals will be implanted with a telemetry sensor that can measure autonomous functions such heart rate and core body temperature. This gives information about the rhythm and possible autonomous disturbances the animals may have or develop during the stress paradigm. In order to measure brain structure and function in vivo, neuroimaging techniques are used, such as Diffusion Tensor Imaging (DTI), resting state functional MRI (rs-fMRI) and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS). Shortly after the last stressor- and behavior experiments the animals will be sacrificed and biological material will be collected for further histological and biochemical analyses.

4) Lastly, after these three experiments, an intervention study will be done utilising the stress model that gives the most robust findings in the animals. This can differ for the different genetically modified animals. The intervention will encompass two different antidepressants. Different antidepressants will be used because it is for example known that some antidepressants have a positive while others have a negative effect on the mitochondria, possibly influencing depression susceptibility for better or for worse (Klinedinst and Regenold 2015). The choice of the specific

antidepressants will be made after all three stress experiments are executed. At this moment this choice cannot be made because it depends on the obtained results as well as the advances that are being made for different effects, and potentially newly discovered antidepressants.

#### 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

All individual components of this project focus on understanding the influence of the different described peptides, mitochondrial function, and miRNAs on depression susceptibility after stress and the potential interactions between these different mechanisms.

The four proposed animal procedures will be executed in succession with each other (see figure 1). This flowchart will be used for each of the five proposed animal models (orexin KO, Ucn1 KO, Ndufs4 deficient, and two virally injected groups). Between the different animal procedures there will not be a go/no-go evaluation moment.

Each animal procedure is first executed with behavioral testing and biochemical and histological analysis only. After the experiment is completed, there is a go/no-go evaluation moment, if differences are found between WT and genetically modified animals MRI experiments will also be utilized (Figure 1). The same paradigm with behavioral tests is executed before the MRI. If no differences are found no MRI experiment will be implemented (see figure 1) and the next animal procedure can be executed. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS to investigate functional and structural differences between animals in vivo.

Before the start of animal procedure 4, there is another go/no-go evaluation moment. All three animal procedures are evaluated and compared for that specific animal model. The paradigm that gave the most reliable and robust results will be used for the intervention experiment to minimize the number of animals used.

# Project overview

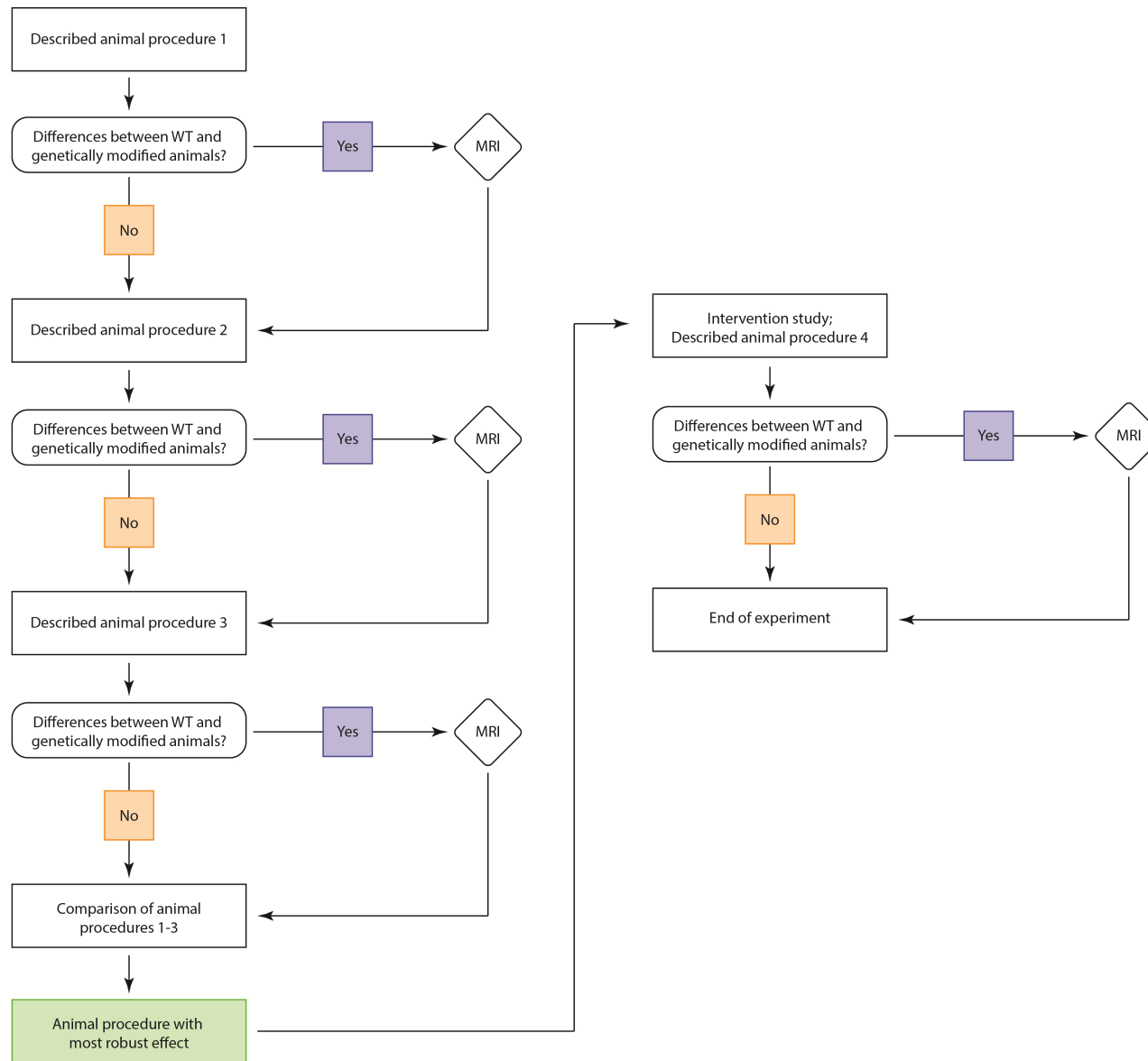


Figure 1: Project overview

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	Chronic variable stress paradigm
2	Chronic Social defeat stress
3	Acute stress paradigm
4	Intervention experiment

**Appendix****Description animal procedures**

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

**1 General information**

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Chronic variable stress paradigm



## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxed' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different above described animal models will be subjected to a chronic variable stress paradigm, a well validated and often used paradigm to induce experimental depressive-behavior in animals. We will assign both the genetically modified animals as well as WT mice randomly to the chronic stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the chronic variable stress group, but without exposing them to the stressor. During and after the chronic stress paradigm mice will be subjected to several behavioral tests to monitor the effect of the chronic stress on the animal's behavior. Different behavioral tests will measure depressive behavior (e.g. novelty suppressed feeding, forced swim test, tail suspension test) as well as well as general behavior such as locomotor activity (e.g. RotaRod, Phenotyper, open field). The weight of the animal will also be measured several times during the paradigm. Shortly after the last stressor or behavioral test the animals will be sacrificed, blood and biological material will be collected, such as the brain, and several other organs. If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.

In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented in the mice. This will both be in WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary readout parameters will be used because it is known for example body weight decreases, plasma corticosterone increases, and mitochondrial function is altered during the stress paradigm. Furthermore these read out parameters are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If a robust statistically significant difference between the different groups is found, neuroimaging will also be conducted. In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

Our aim is to compare genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) respectively), by exposing them to a chronic stress paradigm. During and after the stress paradigm the animals will be exposed to several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. Mice will randomly be assigned to the either the control group or the stress group.

The telemetry sensor that will be implanted can measure core body temperature and activity. Animals will be operated minimally two weeks prior to the stress induction to allow enough time for the animals to recover. The telemetry sensor will be placed subcutaneous under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation).

The miRNA abundance will be influenced via local viral injections in the brain. The virus will be injected during the same operation as the telemetry sensor implantation to allow enough time for incubation and also recovery from surgery and to reduce discomfort of two separate surgeries. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

The genetically modified animals, as well as the WT littermates, are randomly assigned to either the experimental- or the control condition. Both groups will follow similar protocols, with the only difference that the experimental group will be stressed, and the control group will not receive stress. In this experiment, chronic stress is induced by a chronic variable stress paradigm. This paradigm consists of 21 successive days where each day a stressor and/or a behavioral test is presented to the animal. Each animal in the stress group receives the same stressors and these stressors will be presented in a randomized order where each stressor, mentioned in table 1, is presented an equal number of times (except for the behavioral tests mentioned in the table). The duration of the stressor varies between one hour and an overnight time period, depending on the stressor. The stressors that will be used are for example restraint stress, cold stress, confinement, continuous light overnight, social isolation overnight, soiled cage overnight, shaking stress, cage tilting, overnight food deprivation (for more details see table 1). This paradigm is based upon previously experiments as well as described regimens and is well validated and a proven mouse model for depressive behavior in rodents (Stout et al. 2000, Willner 2005, Deussing 2007, Franceschelli et al. 2014).

Table 1. Different stressors used during the chronic variable stress paradigm. These stressors will be presented to the animals in a randomized order one a day.

<b>Stressor</b>	<b>Average duration</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Confinement	Repeated 1h periods	Animals are placed in a small cage	Moderate
Cold stress	1 hour	Animals are exposed to 4°C	Severe
Continuous light	Overnight	Animals are exposed to continuous light overnight	Moderate
Social isolation	Overnight	Animals are isolated overnight; one mouse/cage. This can be for example combined with an Phenotyper for behavioral analysis	Mild
Soiled cage	Overnight	Bedding material will be soiled with water ( $\pm 250$ ml)	Severe
Shaking stress	1 hour	Cages are placed on an orbital shaker ( $\pm 100$ rpm)	Moderate
Restraint	30 min	Animals are placed in a plastic restrainer	Moderate
Cage tilting	Overnight	The home cage of the animals will be tilted overnight	Moderate
Food deprivation	Overnight	Animals will not have access to ad libitum food overnight	Moderate
Novelty suppressed feeding	10 min	Animals will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle; executed after overnight deprivation	Mild
Porsolt swim test	10 min	Animals are placed in a cylinder filled with water and are forced to swim for 6 minutes	Severe
Tail suspension	10-15 min	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces.	Moderate

At the end of the stress paradigm general and depressive related behavior of the animals will be analyzed with several different behavioral experiments. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 2. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 2. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

On the 21st day, shortly after the last behavioral test, the animals will be sacrificed and blood will be taken. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcatheter perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistically significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcatheter perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the behavioral test with the most variation (FST) from previous experiments. The effect size was  $d = 0.982$ , giving a minimal number of animals of 14 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 14 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the stress paradigm. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

## B. The animals

---

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

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and *Ndufs4* deficient (*Ndufs4def*) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the new *Ndufs4def* mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable chronic variable stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. We need a minimum of 14 animals per group, however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 28 animals per group (see table 3). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 14 animals per group, for details see table 3.

**Table 3. Maximal number of animals necessary**

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
Ucn1 KO / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
Ndufs4def / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
MIRNA 1 / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
MIRNA 2 / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
<b>Total</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>900</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	900	Adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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



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

---

No

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

---

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

---

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

---

##### *Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

##### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

##### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related psychopathology, and although it uses a chronic stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

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

---

We are aware that chronic stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Non-applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

---

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

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

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

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the chronic stress paradigm we will not apply anesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

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

---

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

---

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, a chronic stressor has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to chronic stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful will be implemented in the chronic stress paradigm to monitor their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The chronic variable stress paradigm is a widely used approach to investigate stress adaptation and stress associated disorders such as depressive behavior. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behavior (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the chronic stress paradigm or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished well being. If an animal during the

experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressors and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature whereby the incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. Based upon our previous experience with similar experiments with the Ucn1 KO mice, we expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience at the end of the chronic stress paradigm and behavioral tests is considered severe. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to chronic stress is severe; for control mice this cumulative discomfort will moderate or severe, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The discomfort severity of the control mice depends on the cluster of behavioral tests, if the cluster includes the Porsolt swim test it will be severe (50% of the control animals), if not and it includes the tail suspension test it will be moderate (50% of the animals). In total, 75% of the animals will experience severe discomfort and 25% of the animals will experience moderate discomfort.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without

these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Chronic Social defeat stress</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Chronic Social defeat stress
Serial number	Type of animal procedure					
2	Chronic Social defeat stress					

## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different animal models will be subjected to a chronic social stressor by using the well-validated Resident-Intruder paradigm, which uses repeated aggressive confrontations to induce social defeat. The animals will be subjected to a 10-day period of daily confrontations, followed by a social dominance test. Previous research has shown social defeat stress to be a good animal model for depression, whereby not only depressive behavior is induced (Kudryavtseva, et al., 1991; Rygula et al., 2005), but also a robust enduring activation of the HPA axis (Covington & Miczek, 2005; J M Koolhaas et al., 1997). We will assign both the genetically modified animals as well as WT mice randomly to the social defeat stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the chronic stress groups, but these mice will be introduced to a non-aggressive mouse strain. To prevent the stress of confrontation, the cage will be fitted with a barrier to allow the animals to smell, see, and hear each other, however which will prevent the actual interaction. After the stress paradigm mice will be subjected to several behavioral tests to monitor the effect of the stress on the animal's behavior.

If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.



Different behavioral tests will focus on depressive behavior in these animals. Also general behavior such as locomotor activity will be tested (e.g. RotaRod, Phenotyper, and Open Field). The weight of the animal will also be measured several times during the paradigm. Shortly after the last behavioral test the animals will be sacrificed, blood and biological material will be collected, such as the brain, and several other organs. In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented. This will both be WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary readout parameters will be used because it is known for example body weight decreases, plasma corticosterone increases, and mitochondrial function is altered during the stress paradigm. Furthermore these read out parameters are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If a robust statistically significant difference between the different groups is found, neuroimaging will also be conducted. In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

Our aim is to compare genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) respectively), by exposing them to a chronic social defeat paradigm followed by several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. Mice will randomly be assigned to the either the control group or the stress group.

The telemetry sensor that will be implanted can measure core body temperature and activity of the mice. Animals will be operated minimally two weeks prior to the stress induction to allow enough time for the animals to recover. The telemetry sensor will be placed subcutaneous under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation).

The miRNA abundance will be influenced via local viral injections in the brain. The virus will be injected during the same operation as the telemetry sensor implantation to allow enough time for incubation and also recovery from surgery and to reduce discomfort of two separate surgeries. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

The genetically modified animals, as well as the healthy WT littermates, are randomly assigned to either the experimental- or the control condition. Both groups will follow similar protocols, with the only difference being that the experimental group will be introduced to very aggressive BALB/cJ mice while the control animals will be introduced to C57BL/6J mice. The control mice will be in the same cage as the resident and while the mice are being able to see, hear, and smell each other they are not able to have physical contact. Over a ten day period the animals will be introduced daily to

a different resident. Our particular confrontation protocol is similar to DEC-nr.: 2013-235, and the protocol by Koolhaas et al (2013). Animals will be in each others' presence for no longer than 10 minutes (attack latency), in which the attacks can take place. An session will last no longer than 5 minutes after the first attack.

At the end of the stress paradigm general and depressive related behavior of the animals will be analyzed with several different behavioral experiments. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 4. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 4. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

Afterwards blood samples will be acquired and the animals will be sacrificed whereby the method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood plasma, and several other organs will also be collected for additional analysis.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the test with the most variation from previous experiments. The effect size was  $d = 1.05$ , giving a minimal number of animals of 12 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 12 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the social stress paradigm. During the social stress paradigm residents/intruders will be mixed constantly in a way that residents and intruders will never be confronted twice with each other to avoid recognition. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. These considerations will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

---

## **B. The animals**

---

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

---

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

To induce chronic stress through a social defeat paradigm two main groups of animals are needed: a group of residents and a group of intruders (the animals of interest, including the below described genetically modified animals). The residents are required to be more aggressive and dominant than the intruders, in order to induce a stable level of stress and social defeat. BALB/cJ mice will be used as residents, besides being slightly bigger compared to the C57BL/6J mice, they are also more aggressive (Fairless et al., 2012, Velez, et al., 2010). Besides the aggressive BALB/cJ mice, we will use WT littermates as non-aggressive normal behaving animals as a control condition.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and *Ndufs4* deficient (*Ndufs4def*) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the *Ndufs4def* mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect of 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable chronic social defeat stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. We need a minimum of 12 animals per group, however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 24 animals per group (see table 3). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per

animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

The number of residents required for this experiment is the same as the number of intruders described above (see table 5). This ensures that each intruder sees a different resident every time to avoid recognition between the animals.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 12 animals per group, for details see table 5.

**Table 5. Maximal number of animals necessary**

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
Ucn1 KO / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
Ndufs4def / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
MIRNA 1 / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
MIRNA 2 / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
<b>Total</b>	<b>120 / 120</b>	<b>120 / 120</b>	<b>60 / 60</b>	<b>60 / 60</b>	<b>720</b>

	WT	BALB/cJ	WT	BALB/cJ	
Residents	240	240	120	120	720
<b>Total:</b>	<b>480</b>	<b>480</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>1440</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	1440	Adult

---

**C. Re-use**

---

---

Will the animals be re-used?

---

---

 No, continue with question D.

---

---

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

---

---

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

---

---

 No

---

---

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

---

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

---

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

---

*Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

*Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

*Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related

psychopathology, and although it uses a chronic stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

---

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

---

We are aware that chronic social defeat stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## **Repetition and Duplication**

---

### **E. Repetition**

---

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

---

Non applicable

## **Accommodation and care**

---

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

---



**F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the social defeat paradigm we will not preform anesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

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

---

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

---

Stress and single housing of the residents will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, a chronic stressor has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. . During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to social defeat stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful are executed after the resident intruder paradigm to determine their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The stressors' nature is non-invasive, and duration will be strictly monitored, in order to minimize physical- and mental distress, whilst still being able to induce differences between treatment groups. We have selected a maximum time of each separate confrontation (10 minutes), with a maximum of 5 minutes after the first attack. Also, we will make sure that no excessive physical harm is done; we will separate animals and terminate the confrontation prematurely if we deem the risk of excessive physical harm too high. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

### **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the chronic stressor or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, large open wounds, other extreme physical harm, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature, whereby we will closely monitor the attacks, perform proper wound care, and make sure the animals eat well. The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. We expect to have less than 5% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the intruder's point of view in the resident intruder paradigm is considered moderate to severe, depending on the resident they will face. The effect of the behavioral tests is expected to be mild or severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to the aggressive Balb/cJ mice (50%) in combination with the behavioral tests is severe; for the intruders which will face the C57BL/6J mice this cumulative discomfort will be moderate to severe depending on the behavioral tests used. The discomfort for the residents will be moderate, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The mice that will face the C57BL/6J mice and receive the Porsolt swim test will have severe discomfort (50%) while the animals that face the C57BL/6J mice and do not receive the Porsolt swim test will have moderate discomfort (50%). In total, 37.5% of the animals (including both residents and intruders) will experience severe discomfort and 62.5% of the animals will experience moderate discomfort.

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Acute stress paradigm</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Acute stress paradigm
Serial number	Type of animal procedure					
3	Acute stress paradigm					

## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different animal models will be subjected to an acute stressor to investigate the immediate susceptibility to depression. Acute stress will be induced by using one of a variety of well-validated methods, all animals in the same experiment will receive one and the same stressor. We will assign both these genetically modified animals as well as WT mice randomly to the acute stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the acute stress group, but without exposing them to the stressor. On these different animal models several behavioral tests will be executed after the stressor. After the last behavioral test, the animals are sacrificed and several biochemical and histological analyses will be performed. If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.

In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented. This will both be WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or

Table 6. Short descriptions of acute stressors that can be used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Electrical foot shocks	The animals are placed in a skinner box where they will receive a series of inescapable unpredictable foot shocks with a duration of 20-30 min.	Severe
Physical restraint	The animals are placed in a plastic restrainer for 30 min to 1 h	Moderate
Tail suspension	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes.	Moderate
LPS injection	The animals will receive an intraperitoneal injection with lipopolysaccharide (for example E. Coli 055) to elicit an immune and stress reaction	Moderate

Table 7. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate



Shortly after the last behavioral test the animals will be sacrificed. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the test with the most variation from previous experiments. The effect size was  $d = 1.017$ , giving a minimal number of animals of 11 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 11 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the stress paradigm. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

## **B. The animals**

---

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

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and *Ndufs4* deficient (*Ndufs4def*) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the *Ndufs4def* mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable acute stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. This allows us to select the minimum of 10 animals per group however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 20 animals per group (see table 8). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 10 animals per group, for details see table 8.

Table 8. Maximal number of animals necessary

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
Ucn1 KO / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
Ndufs4def / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
MIRNA 1 / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
MIRNA 2 / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
<b>Total</b>	<b>110 / 110</b>	<b>110 / 110</b>	<b>55 / 55</b>	<b>55 / 55</b>	<b>660</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	660	Adult

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

---

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

---

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

---

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

---

##### *Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

##### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

##### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related psychopathology, and although it uses a acute stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

---

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

---

We are aware that acute stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to

minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Non applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

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

---

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

---

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the acute stress paradigm we will not perform anaesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

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

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

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

---

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, acute stress has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to acute stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful will be executed after the stressor to analyze differences in behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The stressors' nature is non-invasive, as well as relatively short (acute), in order to minimize physical- and mental distress, whilst still being able to induce differences between groups. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the acute stressors or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or

veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor, as well as the relatively short duration, and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature, whereby the duration is not long enough that we expect severe stress to occur. The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. Based upon our previous experience with similar experiments with the orexin KO and Ucn1 KO mice, we expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the acute stress paradigm is considered to be moderate or severe, depending on the particular stressor. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to acute stress in combination with the behavioral tests is moderate or severe; for control mice this cumulative discomfort will be moderate or severe as well, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The severity of the discomfort depends on the stressor/behavioral test used, if the Porsolt swim test or electrical foot shocks are used it will be severe, if not and if the other stressor/behavioral tests the discomfort will be moderate. We expect that about 65% of the animals will experience severe discomfort and about 35% to have moderate discomfort.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without



these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Intervention experiment</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Intervention experiment
Serial number	Type of animal procedure					
4	Intervention experiment					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The general design of this experiment is similar compared to the former three experiments. The same animal models will be used in order to study depression susceptibility with altered protein expression, either constitutively, via miRNA intervention or through specific floxing, and/or a decreased mitochondrial function. In this experiment the animals will be treated with different antidepressants. It has been known that different antidepressants have different side effects on for example mitochondrial functioning, some antidepressants can have a positive effect whilst others have a negative effect (Klinedinst and Regenold 2015).

The specific stress model that will be used in this intervention experiment depends on the effects observed from the former three experiments in this project. The stress model will be chosen after these experiments are finished. The stressor that yields the most robust effects on behavioral, biochemical, and immunohistochemical parameters will be used in this experiment. For the different animal models, different stress paradigms might be best suited to elicit depressive behavior or robust biochemical changes. For example, one animal model will give the best results with the chronic variable stress paradigm while another might give the best result to the social defeat stress. Animals will be exposed to the stress paradigm while being treated (with either treatment or vehicle).

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, adrenal weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary read out parameters are used because they are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If these readout parameters establish a robust effect, neuroimaging will also be conducted. At the end of the experiments, behavioral data will be correlated to the biochemical data as well as neuroimaging data on brain structure and function (if neuroimaging is performed). In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

The aim of this experiment is to compare the genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) target sequence respectively), by exposing them to a stressor followed by several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. In addition to the stressor, in this experiment part of the animals will receive an antidepressant treatment. Two different antidepressants will be used depending on their effect on the mitochondria as

described above, as of now lithium chloride and fluoxetine would seem the bests to test at this moment. Animals will randomly be assigned to either the treatment or non-treatment group and all animals will be stressed.

Antidepressants will be given via a so called micro-osmotic pump. This is a small capsule that is inserted subcutaneous containing either an antidepressant or dissolvent. This method will be used because, although it includes surgery, it is less stressful for the animals compared to daily oral administration. At least a week before the stress paradigm, animals receive the micro-osmotic pump with either an antidepressant or dissolvent. This procedure will be done under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation) and the micro-osmotic pump will remain in the mouse for the duration of the experiment.

The animals that will receive a local viral injection will receive this in the same surgery as the micro-osmotic pump implantation. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

After the surgery the animals will be subjected to either an acute stressor, a chronic stress paradigm, or social defeat stress, depending on the results from the representative experiments. The stress paradigm (and thus treatment period) that will be used is based upon the results of the previous experiments. This will also include several behavioral tests which measure behavior of the animals. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 9. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 9. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

Shortly after the last behavioral test, the animals will be sacrificed. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size depends on the stressor that will be used during this experiment to be determined at a later time point. If the chronic variable stress paradigm will be used the effect size is  $d = 0.982$ , giving a minimal number of animals of 14 per group. This example is chosen because this will then also be the maximal number of animals needed in this experiment, for the other stress paradigms fewer animals will be necessary. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 11 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the one of the treatment or control conditions. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences. In previous studies in our lab we observed that the subcutaneous implantation of the micro-osmotic pumps per se did not cause any mortality or extreme discomfort for the animals.

---

## **B. The animals**

---

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

---

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and Ndufs4 deficient (Ndufs4def) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the Ndufs4def mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

At this point in time it is still unsure what specific antidepressants are the best option for this experiment. This is because first all three experiments must be executed and analyzed to determine the best suitable stressor per animal model. The influence of different antidepressants on mitochondrial function is a new and rapidly changing field of research, some antidepressants have a positive effect on mitochondrial function whilst others have a negative effect. As of now the best options would be to use lithium chloride which have a positive effect on the mitochondria and fluoxetine which have a negative effect on the mitochondria. A third treatment group is the control group where the micro-osmotic pumps will be loaded only with vehicle as a control. Depending on the stressor that will be chosen for this experiment, the maximum number of animals that is necessary is 14 animals per group (if chronic variable stress is used).

Previous studies and experience in our lab using comparable stress-paradigms as well as micro pump injections have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. Depending on the stressor that will be used the minimum number of animals per subgroup will be 14. Because we aim to do 4-6 behavioral tests and we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor the number of animals per has to be multiplied by two as described in the previous animal procedures,

totaling 28 animals per group (see table 3). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of maximal 14 animals per group, for details see table 10.

**Table 10. Maximal number of animals necessary**

Animal model	Number of animals per group						Total
	No-MRI			MRI			
	Stress			Stress			
	Anti-1	Anti-2	Veh.	Anti-1	Anti-2	Veh.	
Orexin KO / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
Ucn1 KO / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
Ndufs4def / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
MIRNA 1 / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
MIRNA 2 / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
<b>Total</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>1260</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	1260	Adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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



### C. Re-use

---

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.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

#### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

#### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The behavioural tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioural changes. Viral injections, micro-osmotic pump implementation, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anaesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Also, 3 days post-surgery the animals will receive analgesia. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

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

---

We are aware that stress and the surgery cause discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections, micro/osmotic pump placement, and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

---

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

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

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

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

During viral injections, telemetry sensor implementation, micro-osmotic pump insertion, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of isoflurane inhalation of 1.5%. Otherwise no anaesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

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

---

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

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

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, acute stress has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

A group of animals will be exposed to a stressor, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful are executed after the stress paradigm to determine their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

The stress paradigms planned in this experiment are widely used in the research towards the stress response and stress related behaviors such as depressive behavior. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

### **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.

Some animals may experience more stress than anticipated for the stressors or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or

veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor, as well as the relatively short duration, and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments and experience in our lab with micro-osmotic pump surgery as well as dietary interventions. We expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the stress paradigm is considered severe. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals in this experiment is severe (100%) as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

**Format****Niet-technische samenvatting**

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

## 1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Onderliggende mechanismen van stress-gerelateerde aandoeningen zoals depressie
1.2	Looptijd van het project	1-6-2016 - 1-6-2021
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Stress, depressie, energiehuishouding, neuronale eiwitten

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Op dit moment zijn ongeveer 350 miljoen mensen wereldwijd depressief. Depressie is de grootste oorzaak van ziekteverzuim is volgens de Wereld Gezondheid Organisatie (WHO). Depressie zorgt voor onder andere negatieve gevoelens, veranderde eetlust en verlies van plezier; daarnaast heeft het grote gevolgen voor de samenleving in de vorm van verminderde productiviteit, ziekteverzuim, en dergelijke. Ondanks jarenlang onderzoek zijn de onderliggende mechanismen van depressie nog niet voldoende bekend. Huidige medicijnen werken bij slechts 30-60% van de patiënten. De verwachting is dat depressie wordt veroorzaakt door een combinatie van omgevingsinvloeden zoals stress en bepaalde eigenschappen van de persoon, zoals veranderde eiwitwaarden in de hersenen of verlaagde energiehuishouding in het lichaam. Deze veranderde eiwitniveaus in de hersenen kunnen tot stand komen door kleine structuren genaamd microRNAs. Meer onderzoek gericht op deze theorieën kan leiden tot nieuwe vormen van behandeling en medicijnen waardoor een groter deel van de patiënten persoonlijker- en succesvoller behandeld kan worden.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Met dit project willen we specifieke mechanismen achter depressie ontrafelen, en op die manier een wetenschappelijke bijdrage leveren. Dit kan vervolgens de ontwikkeling van nieuwe medicijnen bevorderen, zodat patiënten beter behandeld kunnen worden. Hiermee hopen wij uiteindelijk te kunnen bijdragen aan het verlagen van de ziektelast, zowel voor de patiënt als voor de maatschappij.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor dit project zullen muizen worden gebruikt. Het maximale aantal muizen dat in dit project zal worden gebruikt, wordt geschat op 4260 muizen.



3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Een van de onderliggende oorzaken van depressie is stress, om dit te onderzoeken zullen de dieren gestrest moeten worden volgens algemeen geaccepteerde en veelgebruikte testen zoals een chronisch variabel stress protocol. Dit zorgt ervoor dat de dieren gestrest raken en depressief gedrag gaan vertonen. De dieren zullen ook worden geopereerd, hiervoor krijgen de dieren pijnbestrijding. Een doel is het inbrengen van een zogenaamd telemetrie apparaatje wat bijvoorbeeld activiteit en lichaamstemperatuur meet. Ook wordt er in een deel van de dieren wordt een klein pompje in het lichaam geplaatst, een zogenaamde micropomp, voor het geleidelijk toedienen van verschillende antidepressiva, zonder dat het dier hier veel last van heeft. Een ander deel van de dieren zal viraal geïnjecteerd worden om genen uit te schakelen. Wederom een ander deel van de dieren zal verdoofd worden en door middel van MRI gescand worden om effecten op hersenactiviteit te meten. Al deze voorgaande procedures zullen gepaard gaan met matige of ernstige vormen van stress en ongerief.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	De verwachte ernst van de dierproeven is matig tot ernstig. Ruwweg 32% van de dieren die in dit project worden gebruikt zal matig ongerief krijgen en 68% ernstig.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na afloop van het experiment worden de dieren gedood om vervolgens verder onderzoek te doen op het weefsel van de dieren.

## 4 Drie V's

4.1	<b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Depressie is een zeer complex proces wat op dit moment alleen onderzocht kan worden in een levend dier. Er zijn naar ons weten geen goede alternatieven voor knaagdiermodellen om de aanpassing aan stress en depressief gedrag te bestuderen.
-----	---	--

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 4.2 | <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.   | De aantallen muizen die nodig zijn voor dit project zijn bepaald op basis van een diepgaand literatuuronderzoek, vergelijkbare experimenten, en statistische analyses. Dit is het minimale aantal dieren dat nodig is voor het testen van onze hypothesen. Bij gebruik van minder dieren zal het niet mogelijk zijn om verschillen tussen groepen te detecteren.                                     |
| 4.3 | <b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Het gekozen model is een zeer geschikt en veelgebruikt diermodel voor stress gerelateerde aandoeningen zoals depressie. Het geeft ons de kans om onze resultaten met een brede basis aan literatuur te vergelijken, en geeft ook het minste ongemak voor de dieren in vergelijking met andere beschikbare modellen.  |
| 4.4 | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.               | Wij zorgen ervoor dat alle dieren op eenzelfde manier worden gehuisvest, waarbij ze vrije toegang tot eten en drinken hebben, de hele dag door. Verder worden de dieren goed in de gaten gehouden en wordt onder andere het gewicht gemeten. Als blijkt dat een dier onnodig veel last heeft tijdens het onderzoek, dan zal in overleg met de dierverzorgers en dierenarts het dier worden geofferd. |

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0117
2. Titel van het project: Unraveling the underlying mechanisms of depression
3. Titel van de NTS: Onderliggende mechanismen van stress-gerelateerde aandoeningen zoals depressie
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 11-01-2016 en 02-02-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 18-01-2016 tot 25-01-2016 en van 08-02-2016 tot 26-02-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 26-02-2016
  - advies aan CCD: 17-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 18-01-2015
  - Strekking van de vragen en opmerkingen:

**Project Proposal:**

    - 2.1 Dit is fundamenteel onderzoek naar het mechanisme waarlangs stress leidt tot depressie-gevoeligheid.
    - 3.1 Het is nog onduidelijk hoe het verband is tussen de stress-hypothese (gebaseerd op een gevonden correlatie tussen stress en gevoeligheid voor depressie) en de mono-aminehypothese. De projectaanvraag behelst het aantonen van mechanismen voor de stress-hypothese, om nieuwe therapeutische targets te vinden. Waarom willen de

onderzoekers dan uiteindelijk een interventiestudie doen met oude middelen? De rationale voor een interventie met deze middelen in relatie tot de nieuwe hypothesen die getest worden ontbreekt. De commissie vindt het interventie experiment geen logisch deel uit maken van dit project en verzoekt de onderzoekers ofwel DAP-4 uit de aanvraag te verwijderen, ofwel duidelijk te beargumenteren waarom dit een logisch onderdeel is van dit project (zie ook 3.4.2).

-3.1 De relatie tussen de onderscheiden te onderzoeken factoren is niet duidelijk. Kunnen de onderzoekers duidelijker toelichten hoe de drie hypothesen onderling samenhangen?

-3.2 De onderzoekers worden verzocht hier alleen een goed afgebakende doelstelling te noemen en de haalbaarheid van die doelstelling binnen dit project toe te lichten. De tekst over de uitwerking van de doelstelling (5 verschillende diermodellen in vier verschillende experimenten) hoort thuis bij het onderdeel strategie. De onderzoekers worden verzocht één of meerdere referenties te geven waaruit blijkt dat dit project een voortzetting is van het onderzoek van deze groep.

-3.2 De onderzoekers worden verzocht de redenering om te draaien: om de mogelijk belangrijke interactie tussen de verschillende mechanismen te onderzoeken worden deze parallel onderzocht.

-3.4.2 Basaal onderzoek naar werkingsmechanismen die ten grondslag liggen aan een klinisch probleem en translationeel onderzoek naar de behandeling van dat probleem liggen doorgaans te ver uit elkaar om in één projectaanvraag te beschrijven. Wel is het denkbaar dat er in het kader van fundamenteel onderzoek enkele interventies worden gedaan ter bevestiging van het beschreven werkingsmechanisme.

-3.4.3 Waarom willen de onderzoekers het effect van drie verschillende soorten stress onderzoeken? De reden daarvoor ontbreekt in de beschrijving van de achtergrond (onderdeel 3.1).

-3.4.3 Wanneer één stressor een verandering in depressie-gevoeligheid oplevert, is het dan nog noodzakelijk om het effect van de andere stressoren te onderzoeken? Verwachten de onderzoekers niet het meest van het chronische stress model?

-3.4.3 Uit de flowchart blijkt dat dierproef 2 pas wordt gestart nadat de resultaten van dierproef 1 zijn geanalyseerd. Worden de resultaten uit dierproef 1 gebruikt om de opzet van dierproef 2 aan te passen? De onderzoekers worden verzocht duidelijker op te schrijven of er tussen de dierproeven ook go/no go momenten zijn, en welke criteria daarvoor gehanteerd zullen worden.

### **Description of Animal Procedures:**

#### **DAP1**

-A1: Waarom worden dezelfde tests (bijvoorbeeld de FST) eerst gebruikt om chronische stress te induceren en daarna ook gebruikt om de mate van depressie veroorzaakt door die stress te meten? Is dat wetenschappelijk wel verdedigbaar?

-A2: De onderzoekers zullen de dieren gedurende 21 dagen blootstellen aan stress en/of gedragstesten. Aan het eind van dit stress-inductie protocol zal het algemene gedrag en depressie-gerelateerd gedrag van de dieren onderzocht worden. Op dag 21 worden de dieren echter gedood. Wordt het gedrag van de dieren al tijdens het stress-inductie protocol onderzocht en zo ja, waarom? Treedt chronische stress en de depressie die daarvan het gevolg is pas na 21 dagen op, of al eerder?

-A2: Welke clusters van gedragsexperimenten maken de onderzoekers? Sommige gedragstesten zijn belastender (FST, TST) dan andere. Deze informatie is van belang om het ongerief voor een individueel dier in te kunnen schatten. Per (groep) dier(en) moet duidelijk worden gemaakt welke stressoren uit tabel 1 zij tijdens de 21 dagen ondergaan en welke gedragstesten uit tabel 2 er op volgen. Het zou overigens verhelderend zijn als de onderzoekers in de tabel voor de individuele gedragstesten het ongerief vermelden.

-A3: Willen de onderzoekers de telemetrie bij slechts 6 dieren uit een groep aanbrengen? Kunnen de 14 dieren dan nog als één groep beschouwd worden als zij niet allemaal een operatie hebben ondergaan?

-B Waarom willen de onderzoekers voor zowel de Orexin-KO als de Ucn1-KO dieren de WT dieren testen? Beide KO-stammen zijn gemaakt uit een C57BL/6J muis. Waarom wordt er slechts één groep van 14 dieren gebruikt voor het MRI experiment terwijl dit experiment precies zo zal verlopen als het niet-MRI experiment waar bij twee groepen nodig zijn, elk met verschillende gedragstesten?

-H: anesthesie tijdens perfusie ontbreekt in de opsomming. Dit staat wel bij D, refinement beschreven. (ook bij de andere DAP2)

- I: Is het ongerief t.g.v. gedragstesten wel altijd mild? FST en TST veroorzaken meer ongerief.

- K: welk percentage van de dieren zal licht ongerief ondergaan? De commissie is van mening dat de Porsolt zwemtest, de Tail suspension test, de cold stress en het gedurende een nacht huisvesten in een natte kooi ernstig ongerief voor de dieren veroorzaakt.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-2.1 Wij hebben de categorie translationeel onderzoek weg gehaald zodat het alleen in de categorie fundamenteel onderzoek zit.

-3.1 In dit project wordt de interventiestudie uitgevoerd met gevalideerde en algemeen gebruikte antidepressiva. De reden hiervoor is dat deze medicijnen al langere tijd op de markt zijn waardoor dit onderzoek, als er goede resultaten worden gevonden, uiteindelijk sneller voor meer gepersonaliseerde zorg kan zorgen. De patiënten hebben er op deze manier ook sneller baat bij.

Het doel van deze interventie studie is om verschillende mechanismen te onderzoeken en te verifiëren. Het is bijvoorbeeld bekend dat sommige antidepressiva bijwerkingen op de mitochondriële functie hebben. Sommige hebben een positief effect op de mitochondriën terwijl andere een negatieve invloed hebben. In dit interventie experiment wordt bijvoorbeeld onze hypothese dat mitochondriële dysfunctie een onderliggende oorzaak van depressie is verder getest en geverifieerd in de verschillende diermodellen. Dit interventie experiment is dus een logisch vervolg van de voorgaande experimenten en er wordt onder andere de vraag beantwoord of een negatief effect van de antidepressiva op de mitochondriën een effect heeft op het gedrag van de dieren met bijvoorbeeld een mitochondrieel probleem als oorzaak van het depressieve gedrag. Of heeft alleen het antidepressivum met een positief effect een invloed op het gedrag. Hiermee worden bepaalde onderliggende mechanismen die gevonden zijn in de eerste drie experimenten aangetoond of juist afgewezen.

Ondertussen wordt er ook nog steeds veel onderzoek gedaan naar nieuwe medicijnen voor depressie, maar ook voor het beïnvloeden van mitochondriën, deze zijn echter nog niet beschikbaar. Als er in de nabije toekomst nieuwe geneesmiddelen worden uitgebracht dan zullen wij deze nieuwe middelen ook overwegen te gebruiken als deze binnen de vraagstelling vallen, zoals ook staat beschreven in de laatste zin van sectie 3.4.2 van de projectaanvraag: "... At this moment this choice cannot be made because it depends on the obtained results as well as the advances that are being made for different effects, and potentially newly discovered antidepressants".

Het volgende is toegevoegd aan de laatste paragraaf van 3.1:

"Lastly, an intervention study is utilized to test the influence of different antidepressants on depressive behavior in the stressor that gives the most robust effect in each animal model. This experiment will be done using two different classical antidepressants. These antidepressants will be chosen on for example their effect on the mitochondria. It is known that different antidepressants have a different effect on the mitochondria, some will have a positive effect whilst others have a negative effect on mitochondrial function. This intervention experiment will verify and potentially strengthen results found in first three stress experiments. Classical antidepressants are used because they are readily available and widely used, consequently if this research finds promising new results and uses for these classical antidepressants this could faster lead to more personalized health care. "

-3.1 De onderliggende basis van de drie hypothesen is dat deze alle drie invloed hebben op de stress response en op depressie susceptibiliteit zoals aangegeven in de projectaanvraag. Wat verder van belang is, is dat de drie hypothesen ook nog invloed op elkaar hebben. Zo is het bijvoorbeeld bekend dat miRNAs directe invloed hebben op heel veel verschillende eiwitten waaronder ook Ucn1 (Aschrafi et al. 2015), zoals al uitgebreid is besproken in de projectaanvraag. Verder hebben verschillende eiwitten, zoals de beschreven Ucn1 (Lawrence et al. 2004, Townsend et al. 2007, Davidson et al. 2009) en orexine (Sellayah et al. 2011), ook een direct effect op de mitochondria. Een dysregulatie van deze eiwitten kan hierdoor dus ook een directe invloed hebben op mitochondriële functie. Op deze manier kunnen de miRNAs indirect ook een invloed hebben op de mitochondriën door verschillende eiwitten te reguleren. Het is echter ook al bekend dat verschillende miRNAs een direct effect op de mitochondriën hebben (Chan et al. 2009, Chen et al. 2010). Of de mitochondriën ook een invloed hebben op de verschillende beschreven eiwitten en miRNAs is naar ons weten nog niet bekend, dit wordt dan ook in dit project onderzocht. Op deze manier komt naar boven dat deze drie hypothesen heel nauw met elkaar zijn verbonden. Hoe deze relaties echter precies zijn en welke processen upstream dan wel downstream zijn in depressie en wat voor een effect dit op de depressie symptomen heeft is echter nog onbekend en dit project draagt hieraan bij.

In dit project wordt er ook stilgestaan bij het feit dat depressie niet één ziekte is. Depressie kent veel verschillende symptomen (e.g. Criteria A in DSM V) waarbij de diagnose depressie al wordt gesteld als een aantal van de symptomen zich voordoet. Symptomen zijn bijvoorbeeld depressief gevoel, irriteerbaar, verminderde interesse of plezier in plezierige activiteiten, gewichtsverandering, verandering in eetlust, slaapstoornissen, verandering in activiteit, vermoeidheid en verlies van energie. De verschillende modellen worden dus niet alleen gebruikt omdat ze een interactie hebben met elkaar, maar ook vanwege de uiteenlopende symptomen. Een probleem bij depressie is dat de diagnose depressie al

gesteld wordt als een subset van de symptomen die worden geassocieerd met depressie zich voordoet bij een persoon. Op deze manier heeft ook niet iedereen met depressie dezelfde symptomen. Dit kan duiden op verschillende onderliggende oorzaken en mechanismen die tot de divergentie van symptomen leiden. Met de verschillende diermodellen die in dit project worden gebruikt proberen wij verschillende symptomen uit te lichten. Zo kunnen wij hiermee bijvoorbeeld onderzoeken of orexine meer invloed heeft op de verandering in het gewicht, eetlust of slaapstoornissen als symptomen, of dat de mitochondriën bijvoorbeeld meer een invloed hebben op vermoeidheid, verlies van energie of een verandering van de activiteit als symptomen van depressie. Op deze manier, samen met de drie verschillende stressoren, proberen wij te achterhalen wat de verschillende potentiële onderliggende oorzaken voor depressie zijn welke ook tot eventueel verschillende symptomen kunnen leiden.

Om dit ook te verduidelijken in de projectaanvraag is de volgende tekst toegevoegd aan het einde van sectie 3.1:

“As described above, all three hypotheses have an influence on the stress response as well as on depression susceptibility. However, it seems that they also interact with each other. For example, miRNAs have a direct influence on different proteins such as Ucn1 (Aschrafi et al. 2015). Also the different described proteins such as Ucn1 (Lawrence et al. 2004, Townsend et al. 2007, Davidson et al. 2009) and orexin (Sellayah et al. 2011) have a direct influence on the mitochondria. A dysregulation of these proteins could also have a direct influence on mitochondrial functioning. In this way miRNAs can also have an indirect influence on the mitochondria by regulating or dysregulating different proteins. However, it has also been found that different miRNAs have a direct effect on the mitochondria (Chan et al. 2009, Chen et al. 2010). If this is also the other way around, that the mitochondria have a direct effect on the described proteins or miRNAs is unclear, this will also be investigated in this project. It seems that these three hypotheses are tightly linked, however what the mechanisms are, what processes are upstream or downstream, and what their influence is on depression symptoms are, is unknown. This project will contribute to unraveling this. In this project we will also investigate the fact that depression is not only one disease. Depression has many different symptoms (e.g. Criteria A in DSM V) where only 5 out of 9 symptoms are required for the diagnosis depression. The different symptoms are depressed mood or irritable, decreased interests or pleasure, significant weight change or change in appetite, change in sleep, change in activity, fatigue or loss of energy, guilt/worthlessness, concentration, and suicidality. The different animal models will not only be used because they have interacting mechanisms, but also because they can shed light on potential different mechanisms underlying different symptoms of depression. Because only 5 out of 9 symptoms must be present to diagnose depression, there are many different combinations possible resulting in the fact that not everyone have the same symptoms. This can point towards different mechanisms that we can potentially investigate with the different animal models. For example, this way we can investigate if orexin influences the change in weight, appetite or sleep as depression symptoms, or that the mitochondria are underlying the fatigue, loss of energy or a change of activity. Together with the three different stress models we try to elucidate the potential different underlying causes of depression that can explain the different symptoms with different people.”

-3.2 Er zijn een aantal kleine veranderingen gedaan in de tekst van de doelstelling (dikgedrukte tekst) en de tekst over de uitwerking van de doelstelling is verplaatst naar het onderdeel strategie.

“This project aims to provide several important novel insights in the etiology and biological underpinnings of stress related disorders such as depression using various translational animal models. For example, the involvement of mitochondria in the susceptibility in depression, the involvement of certain microRNAs in the pathophysiology of stress related disorders, as well as the involvement of different peptides such as Ucn1, orexin, and CRF in the stress response and depression susceptibility. **In addition to this, possible interactions between these different biological underpinnings will also be investigated as well as how much these could contribute to the pathology of various Category A depression symptoms (DSM V) like fatigue, sleep problems, psychomotor retardation, etc.** The use of novel hypotheses, as outlined in section 3.1, in combination with well-validated models for stress-related psychological diseases with the focus on depression, will help us better understand the underlying mechanisms of stress related psychiatric diseases **as well as a better understanding of the various category A symptoms of depression.** Consequently, it could also give new insights in identifying novel therapeutic targets and treatment strategies of major depression. In addition, important data will be acquired to better understand fundamental mechanisms contributing to stress adaptation, and consequently will increase our insight into neuronal processes that may underlie unsuccessful adaptation to stress and depression susceptibility. Ultimately, this may lead to the development of new treatment targets **or the re-categorization of current treatments which is investigated in experiment 4.** Because the project examines various mechanism in parallel, it also offers the possibility to investigate the interaction between the above detailed mechanisms in depression vulnerability. We will be able to identify different behavioral, physiological, and endocrine aspects of depression that can be correlated/compared to similar parameters in humans giving this project a great translational value.”

Enkele referenties zijn toegevoegd die aangeven dat dit project een voortzetting is van onze groep is. In de laatste zin van de laatste paragraaf (vetgedrukt is toegevoegd):

“...This project will be a continuation of the research that has already been performed in this lab towards unraveling the underlying mechanisms of depression. **Previous experiments encompass miRNA 326 and Ucn1 (Aschrafi et al. 2015), orexin and stress (██████████), Ucn1 and depression (Kozicz 2007, Spencer et al. 2012), as well as mitochondrial function and depression (██████████).**”

-3.2 De redenering is omgedraaid. In sectie 3.2 staat nu het volgende:

“... In order to investigate the interaction between the above detailed mechanisms in depression vulnerability, the various mechanisms mentioned in the background are examined in parallel. ...”

-3.4.2 Wij zijn het hiermee eens, naar aanleiding van het eerste punt is ook de translationeel categorie weg gehaald. In dit project wordt de interventiestudie gebruikt voor het testen van de onderliggende mechanismen. Als bijvoorbeeld een lagere mitochondriële activiteit de oorzaak is van depressie symptomen bij een bepaalde patiënt, kan een antidepressivum waarvan bekend is dat deze een negatieve invloed heeft op de mitochondria wel een positief effect hebben op de depressie symptomen. Met dit interventie experiment kunnen wij



bepaalde onderliggende werkingsmechanismen aantonen of juist afwijzen zoals beschreven in antwoord op de bovenstaande eerste vraag over 3.1.

-3.4.3 Het is al bekend dat stress een invloed heeft op het krijgen van depressie. Het is ook bekend dat verschillende soorten stress verschillende effecten hebben op verschillende individuen en dat er verschillende onderliggende mechanisme worden geactiveerd (Lamb 1979, Briski and Gillen 2001, Kavushansky et al. 2009). Het is dus belangrijk om verschillende stressoren toe te passen in de diermodellen die wij hier gebruiken om deze verschillen te onderzoeken. De twee chronische stressoren die in dit project worden gegeven belichten andere aspecten van stress en de invloed op depressie. De ene stressor focust zich meer op de fysieke kant en onvoorspelbaarheid van stress (chronische stress) terwijl de andere zich meer focust op de psychologische kant van stress (sociale stress) (zoals beschreven in 3.4.2). Ook is het gebruik van verschillende stressoren belangrijk omdat depressie niet één ziekte is, zoals al in een eerder antwoord hierboven aangegeven. Voor de diagnose depressie zijn maar 5 van de 9 categorie A symptomen nodig. Met deze twee verschillende chronische stressoren verwachten wij bij de verschillende diermodellen andere uitkomsten. De acute stress draagt hier ook aan bij, deze is noodzakelijk om te bepalen of er in de verschillende diermodellen een verschil is in de initiële stress response wat de effecten van de chronische stressoren zou kunnen verklaren.

Om deze redenatie duidelijker naar voren te laten komen in de projectaanvraag is in onderdeel 3.1 het volgende toegevoegd:

“This project also utilizes three different kinds of stressors, namely chronic variable stress, chronic social defeat stress, and acute stress. These three stressors are necessary because it is known that physical and psychological stressor have other effects on different individuals and on underlying mechanisms (Lamb 1979, Briski and Gillen 2001, Kavushansky et al. 2009). The chronic variable stress focusses more on the physical and unpredictable component of the stressor while the social defeat stress focusses more on the psychological component of stress. To determine if the initial stress response is different between WTs and the different animal models in this project an acute stressor is used.”

-3.4.3 Zoals bij de hierboven beantwoorde vraag uitgebreid is uitgelicht, is het noodzakelijk om verschillende stressoren te gebruiken, een meer fysieke stressor en een meer psychologische stressor. Hiernaast wordt dan de acute stressor gebruikt voor inzicht in de initiële stress response bij de verschillende diermodellen.

Wij verwachten niet per se het meeste effect van het chronische stress model, het sociale stress model is ook een erg goed beschreven en robuust model voor het onderzoek naar depressie gevoeligheid. Daarnaast is deze stressor van een andere aard dan de chronische variabele stress waarvoor wij dus ook andere uitkomsten in bijvoorbeeld categorie A gedrag verwachten bij de verschillende diermodellen. Dit geeft dan weer meer inzicht in de verschillende potentiële onderliggende mechanismen.

-3.4.3 Tussen dierproeven 1, 2 en 3 zitten geen go/no go momenten. Dit omdat enerzijds alle stressoren toegepast dienen te worden om een zo compleet mogelijk beeld te krijgen binnen dit project, en anderzijds omdat de verschillende dierproeven niet op elkaar gebaseerd zijn. De opzet van de verschillende dierproeven is wel hetzelfde, maar niet afhankelijk van de vorige dierproef en de resultaten hebben geen directe invloed op.

Om dit duidelijker te maken in het project is de volgende tekst toegevoegd (dikgedrukt is toegevoegd):

“The four proposed animal procedures will be executed in succession with each other (see figure 1). This flowchart will be used for each of the five proposed animal models (orexin KO, Ucn1 KO, Ndufs4 deficient, and two virally injected groups). **Between the different animal procedures there will not be a go/no-go evaluation moment.**”

#### **Description of Animal Procedures:**

DAP1 Als bijvoorbeeld de FST wordt gebruikt als stressor tijdens de chronische stress zal dit aan het begin zijn van het protocol. Deze test zal dan zowel dienen als stressor en als gedragstest, en dient ervoor om een baselinewaarde voor elk dier te bepalen. Op deze manier kunnen wij het gedrag van deze dieren ook longitudinaal volgen en vergelijken voor en na het stressprotocol binnen een individu. Op deze manier dient deze gedragstest als twee functies.

-A2: De chronische stress treedt geleidelijk op en uit voorgaand onderzoek blijkt dat 21 dagen voldoende is om depressief gedrag te induceren. Dit betekent niet dat de dieren op dag 20 geen depressief gedrag vertonen en op dag 21 wel, net als de chronische stress is dit een geleidelijk proces. Het gedrag zal niet abrupt veranderen op de laatste dag. Om deze reden zal bekeken worden of op de laatste paar dagen al een gedragsexperiment kan worden geïmplementeerd dat ook stressvol is voor de dieren. Een voorbeeld is om een ‘novelty suppressed feeding’ test uit te voeren. Om deze test uit te voeren moeten de dieren de nacht van tevoren niet hebben gegeten (overnacht zonder voer) wat ook een stressor is. Op deze manier wordt het dier gestrest en kan er tegelijkertijd een gedragstest worden uitgevoerd tegen het einde van het protocol waardoor er op dag 21 niet drie testen achter elkaar uitgevoerd hoeven te worden wat voor meer ongerief zou hebben gezorgd. Aan het begin van het stressprotocol kan ook bijvoorbeeld een FST worden uitgevoerd als baselinemeting, zie ook het antwoord op de vraag hierboven.

-A2: Het is correct dat in dit project verschillende gedragstesten zitten met een verschillende belasting op het ongerief van de dieren. Hiermee wordt rekening gehouden tijdens het plannen van de experimenten. De clusters van gedragsexperimenten zullen zo gemaakt worden dat zwaar belastende gedragstesten, zoals de FST en TST, niet beide op een dier wordt toegepast. Een zwaar belastende gedragstest zal altijd worden uitgevoerd met twee mildere gedragstesten. Aan het einde van het stressprotocol en de gedragstesten is het ongerief voor de dieren die het chronische variabele stress proton ondergaan cumulatief ernstig. Dit is echter ook noodzakelijk omdat depressie ook is geassocieerd met ernstige stress, milde stress resulteert niet in depressie.

De volgende tekst is toegevoegd aan de DAP (dikgedrukt is toegevoegd):

“At the end of the stress paradigm general and depressive related behavior of the animals will be analyzed with several different behavioral experiments. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. **The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. ...**”

De stressoren die in tabel 1 staan zullen allemaal worden gebruikt in het chronisch variabel stress protocol. Dit is noodzakelijk om de onvoorspelbaarheid van de stressoren te waarborgen. Als er minder verschillende stressoren worden toegepast dan zullen de dieren er gemakkelijker aan kunnen wennen en potentieel anticiperen waardoor het protocol

minder effectief is (Willner 2005). Alleen de gedragstesten die genoemd zijn in tabel zullen niet altijd gebruikt worden.

De volgende tekst is toegevoegd aan de DAP ter verduidelijking (dikgedrukt is toegevoegd):  
“... Each animal in the stress group receives the same stressors and these stressors will be presented in a randomized order where each stressor **mentioned in table 1** is presented an equal number of times **(except for the behavioral tests mentioned in the table)**. ...”

Verder is het ongerief van de individuele stressoren en gedragstesten aan de tabellen toegevoegd.

-A3: Dit is een fout van onze kant, deze zin had er niet meer in moeten staan en is dus ook verwijderd. Onze initiële opzet was dat een aparte groep zou worden geïmplementeerd met een telemetrie sensor, maar van dit concept zijn wij afgestapt. Nu zullen alle dieren worden geopereerd.

-B Het is inderdaad zo dat beide stammen een C57BL/6J achtergrond hebben, echter hebben wij voor de drie beschreven genetisch gemodificeerde diersystemen een heterozygote fok. Dit is voornamelijk om ervoor te zorgen dat het gedrag van de moeder naar de pups toe gelijk is bij de WT en KO dieren. Het is namelijk bekend dat bij een homozygote fok de moeders van WT en KO muizen anders voor de pups zorgen wat veel invloed heeft op stress en depressie onderzoek. Omdat de heterozygote orexine en Ucn1 moeders een verschillend genotype hebben en dus potentieel verschillend gedrag richting de pups hebben zal in dit project beide WT en KO dieren moeten testen van de orexine KO en Ucn1 KO dieren.

De reden dat er maar één groep dieren wordt gebruikt voor het MRI experiment is omdat wij tijdens het go/no-go moment evalueren welke gedragstesten het meest robuuste resultaat geven. Hieruit kiezen wij dan maar één cluster van drie gedragstesten om het aantal dieren te verminderen. Aan het einde van sectie 2B staat dit ook beschreven: “If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 14 animals per group, for details see table 3.”

In sectie 2A is dit ook aangepast (dikgedrukt is toegevoegd):

Sectie 2A tweede stuk begin laatste alinea: “If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. **Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals.** ...”

-H: In de opsomming hebben wij de anesthesie tijdens de perfusie meegenomen (dikgedrukt is toegevoegd):

“During viral injections, telemetry sensor implementation, **perfusion as a method of sacrifice**, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. ...”

-I: Wij zijn het hiermee eens, de twee genoemde gedragstesten geven meer stress aan de dieren. Dit hebben wij nu veranderd:

“... Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. ...”

- K: Wij zijn het niet eens met de commissie dat de Porsolt zwemtest en tail suspension test ernstig ongerief veroorzaken. Wij zijn van mening dat deze gedragstesten matig ongerief veroorzaken bij de dieren door de korte tijdsduur van de test. Dit hebben wij ook gevonden in een document voor de ongeriefscores van de DEC van Groningen. Over de ernstigheid van de cold stress en overnacht huisvesten in een kooi met natte bedding zijn wij het wel eens met de commissie, dit is dan ook veranderd naar ernstig ongerief. Uiteindelijk hebben wij de ongeriefscores herbeoordeeld, aan het einde van het chronische stress protocol en de gedragstesten hebben de dieren ernstig ongerief. De dieren die niet het chronische stress protocol volgen zullen matig ongerief hebben aan het einde.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 08-02-2016

- Strekking van de vragen:

**Description of Animal Procedures:**

-De Porsolt zwemtest geeft naar het oordeel van de commissie bij muizen, die veel minder goed kunnen zwemmen dan ratten, ernstig ongerief. Niet de duur van de test, maar het feit dat er sprake is van uitputting en de angst om te verdrinken bepalen in dit geval het ongerief. De commissie weet zich daarin gesteund door bijlage VIII van de Europese richtlijn 2010/63/EU, deel III onderdeel 3. m). De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen in de projectaanvraag.

Datum antwoord: 11-02-2016 en 25-02-2016 (dikgedrukte tekst)

- Strekking van de antwoorden:

**Description of Animal Procedures:**

- In de beschrijving van de dierprocedures is het ongerief van het gebruik van de Porsolt zwemtest veranderd van matig naar ernstig ongerief. Dit is gedaan in alle tabellen en tekstdelen.

In de classificatie van de ernstigheid is de volgende tekst ook nog toegevoegd aan de eerste drie experimenten:

DAP1:

The discomfort severity of the control mice depends on the cluster of behavioral tests, if the cluster includes the Porsolt swim test it will be severe **(50% of the control animals)**, if not and it includes the tail suspension test it will be moderate **(50% of the animals)**. **In total, 75% of the animals will experience severe discomfort and 25% of the animals will experience moderate discomfort.**

DAP2:

The discomfort severity which will face C57BL/6J mice depends on the cluster of behavioral tests. **The mice that will face the C57BL/6J mice and receive the Porsolt swim test will have severe discomfort (50%) while the animals that face the C57BL/6J mice and do not receive the Porsolt swim test will have moderate discomfort (50%). In total, 37.5% of the animals (including both residents and intruders) will experience severe discomfort and 62.5% of the animals will experience moderate discomfort.**

DAP3:

The severity of the discomfort depends on the stressor/behavioral test used, if the Porsolt swim test or electrical foot shocks are used it will be severe, if not and if the other stressor/behavioral tests the discomfort will be moderate. **We expect that about 65% of the animals will experience severe discomfort and about 35% to have moderate discomfort.**

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

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

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to provide important novel insights in the etiology and biological underpinnings of stress related disorders such as depression using various translational animal models.' De onderzoekers richten zich daarbij op de bijdrage van mitochondriën, van bepaalde microRNAs en van de peptides Ucn1, orexin en CRF aan de gevoeligheid voor depressie gemeten op gedrags-, fysiologisch en hormonaal niveau. De onderzoekers hebben in antwoord op vragen van de DEC voldoende aannemelijk gemaakt dat de hypotheses die aan het onderzoek ten grondslag liggen (over de rol van de mitochondriën en over de rol van bepaalde microRNAs en de peptides Ucn1, orexin en CRF bij gevoeligheid voor depressie) met elkaar samenhangen. De te behalen resultaten zullen duidelijk maken of deze factoren afzonderlijk of door interactie met elkaar van invloed zijn op het ontstaan van depressie na blootstelling aan stress, en of zij samenhangen met specifieke symptomen van depressie bij muizen. Voorts levert dit onderzoek aanknopingspunten op voor verder onderzoek naar differentiële toepassing van antidepressiva voor subgroepen van patiënten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat veel mensen gedurende hun leven een depressie doormaken. De WHO rapporteert dat depressie op dit moment wereldwijd de belangrijkste ziekteoorzaak is. Depressie heeft niet alleen een grote impact op de patiënt zelf, maar ook op zijn of haar familie. Aangezien depressie op alle leeftijden kan optreden is er ook een grote economische impact op de maatschappij. De DEC acht meer inzicht in het ontstaan van depressie na blootstelling aan stress en effectievere therapie voor depressie van substantieel belang, gezien de omvang van het probleem en de grote groep patiënten die geen baat heeft bij de huidige behandeling met antidepressiva.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de

voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot meer inzicht in neuronale processen die mogelijk ten grondslag liggen aan onvoldoende aanpassing aan stress en gevoeligheid voor depressie.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de stress waaraan de dieren worden blootgesteld. De DEC schat het ongerief als gevolg van de meeste gedragstesten en enkele stressoren, en het imagen onder anesthesie waarna het dier wordt gedood in als licht. Het ongerief als gevolg van de meeste stressoren en de operatie voor het aanbrengen van telemetrie-apparatuur of een micro-osmotische pomp waarbij sommige dieren tevens een injectie in de hersenen krijgen schat de commissie in als matig. De DEC schat het ongerief als gevolg van de forced swim test, de koudestress, het gedurende de nacht verblijven in een natte kooi en de onvermijdbare elektrische schokken in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 32% van de dieren en ernstig voor 68% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Het gedrag na blootstelling aan stress kan alleen goed bestudeerd worden bij proefdieren. Het gedragsrepertoire van de muis is voldoende complex om de translationele waarde van dit onderzoek te waarborgen. De onderdelen van het onderzoek die zonder proefdieren uitgevoerd kunnen worden, zijn al uitgevoerd of zullen *in vitro* uitgevoerd worden. Voor de resterende onderzoeksvragen is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4260 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Operaties aan de dieren worden gecombineerd zodat zij slechts éénmaal hoeven te herstellen van de narcose. Depressie is een ernstige aandoening die kan ontstaan na blootstelling aan ernstige stress. Mildere vormen van stress leiden niet tot depressie, waardoor deze ernstige stress onvermijdelijk is om het effect van stress op de gevoeligheid voor depressie te kunnen onderzoeken. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven verder zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.  
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in neuronale processen die mogelijk ten grondslag liggen aan het verschijnsel dat onvoldoende aanpassing aan stress de gevoeligheid voor depressie lijkt te verhogen. Voorts wordt duidelijk of bepaalde processen samenhangen met specifieke symptomen van depressie. Het is aannemelijk dat de medicatie van depressieve mensen hierdoor beter kan worden afgestemd op het individuele ziekteproces. Het belang van meer inzicht in de factoren die bijdragen aan de gevoeligheid voor depressie na blootstelling aan stress acht de DEC substantieel, omdat veel mensen gedurende hun leven een depressie zullen doormaken en de huidige behandeling met antidepressiva bij veel mensen onvoldoende effect heeft.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 32% van de dieren matig ongerief en 68% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de stress waaraan zij worden blootgesteld in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie realiseert zich dat het hier gaat om grote aantallen muizen die ernstig ongerief zullen ondervinden door de stressoren waaraan zij worden blootgesteld. Er is echter geen andere manier om de onderzoeksvraag goed te kunnen onderzoeken, en in het licht van de omvang en de ernst van het probleem dat wordt onderzocht acht de commissie deze experimenten aanvaardbaar. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

## **E. Advies**

### **1. Advies aan de CCD**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD

### **2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.**



> 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  
AVD103002016481

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016481. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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



**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101  
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]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB [REDACTED] 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: 1 juni 2016  
Geplande einddatum: 1 juni 2021  
Titel project: Unraveling the underlying mechanisms of depression  
Titel niet-technische samenvatting: Onderliggende mechanismen van stress gerelateerde aandoeningen zoals depressie  
Naam DEC: RU Dec  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.584,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 18 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn  
Postbus 9101

6500 HB [REDACTED] 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  
AVD103002016481

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700481

Ordernummer: 040823-461220/ 2015-0129/ [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016481	€ 1.584,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen  
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centrale  
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016481

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 19 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Unraveling the underlying mechanisms of depression" met aanvraagnummer AVD103002016481. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

1) U beschrijft in uw aanvraag meerdere gedragstesten te willen gebruiken om de depressie in muizen te meten/te onderzoeken. U geeft aan dat de groepen die voor het MRI onderzoek worden gebruikt alleen met de meest veelbelovende gedragstesten worden getest. In het kader van vermindering en verfijning, zouden we u willen vragen of in de dierproeven 3.4.4.2 - 3.4.4.4 ook alleen de meest betrouwbare testen uit dierproef 3.4.4.1 gebruikt kunnen worden. Dat zou voorkomen dat extra groepen dieren nodig zijn voor testen die in hetzelfde model geen positieve resultaten laten zien. U geeft aan dat de dierproeven niet parallel worden uitgevoerd, dus dit zou in uw planning haalbaar zijn.

2) In de bijlage dierproeven 3.4.4.2 geeft u aan één 'residentmuis' per testmuis te willen gebruiken, dus net zoveel residentmuizen als testmuizen nodig te hebben. Kunt u onderbouwen waarom u de residentmuizen niet kunt hergebruiken, verwacht u dat alle 720 testmuizen tegelijkertijd worden getest? In het kader van mogelijkheden tot vermindering verzoeken we u om hierop te reageren.

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

**Datum**  
19 april 2016  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016481

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk **maandag 25 april 2016**.

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



**1) U beschrijft in uw aanvraag meerdere gedragstesten te willen gebruiken om de depressie in muizen te meten/te onderzoeken. U geeft aan dat de groepen die voor het MRI onderzoek worden gebruikt alleen met de meest veelbelovende gedragstesten worden getest. In het kader van vermindering en verfijning, zouden we u willen vragen of in de dierproeven 3.4.4.2 - 3.4.4.4 ook alleen de meest betrouwbare testen uit dierproef 3.4.4.1 gebruikt kunnen worden. Dat zou voorkomen dat extra groepen dieren nodig zijn voor testen die in hetzelfde model geen positieve resultaten laten zien. U geeft aan dat de dierproeven niet parallel worden uitgevoerd, dus dit zou in uw planning haalbaar zijn.**

Onze hypothese is dat depressie niet een homogene ziekte is, maar een samenspel van verschillende symptomen welke zeer waarschijnlijk ontstaan door verschillende onderliggende biologische processen. Zoals ook beschreven in sectie 3.1 van het project voorstel is het zo dat niet iedereen met depressie dezelfde symptomen heeft. Verder verwachten wij dat verschillende stressoren verschillende biologische processen in het lichaam activeren die kunnen leiden tot depressie. De verschillende gedragstesten die in dit project worden gebruikt onderzoeken de verschillende symptomen van depressie. In de dierproeven 3.4.4.1 – 3.4.4.4 testen wij verschillende onderliggende biologische processen, hierdoor verwachten wij dat in de verschillende dierproeven een verschil in gedrag is te zien. Het kan bijvoorbeeld zo zijn dat in dierproef 3.4.4.1 een effect wordt gevonden in de Porsolt zwemtest, terwijl voor dierproef 3.4.4.2 de Porsolt zwemtest wellicht geen verschil laat zien. Dit kunnen wij echter niet van tevoren vaststellen, dit is namelijk een van de innovatieve aspecten die wij in dit project onderzoeken. Om deze reden is de exclusie van verschillende gedragsexperimenten op basis van dierproef 3.4.4.1 niet mogelijk en is het van belang dat alle gedragstesten worden uitgevoerd in de verschillende dierexperimenten. Het klopt dat wij voor de MRI alleen de gedragstesten gebruiken die het meeste effect laten zien, dit is dus mogelijk omdat in dezelfde dierproef dezelfde onderliggende biologische processen worden onderzocht.

Voor dierproef 3.4.4.4 is er wel een mogelijkheid om te bekijken welke gedragstesten worden gebruikt. Als blijkt dat er maar 3 gedragstesten interessant zijn om uit te voeren dan hebben wij de helft minder dieren nodig. Als echter blijkt dat meer dan 3 verschillende gedragstesten belangrijk zijn om uit te voeren dan zal er als nog de originele hoeveelheid dieren nodig zijn.

Dit hebben wij nu in een go/no-go moment verwerkt. Hierdoor veranderd het maximale aantal van de aanvraag echter niet. De tekst in groen is toegevoegd aan 3.4.3 van het project voorstel: “... The paradigm that gave the most reliable and robust results will be used for the intervention experiment to minimize the number of animals used. Also, if less than three behavioral tests are interesting to investigate in this experiment we will use only one cluster of behavioral tests and not two clusters as in the previous experiments, thus reducing the number of animals used.”

En het volgende is toegevoegd (in groen) aan de sectie B van DAP 4: “... Depending on the stressor that will be used the minimum number of animals per subgroup will be 14. Depending on the number of behavioral tests that yielded interesting results from the experiment that this intervention experiment is based upon, we might need only one cluster of animals. If 3 or fewer behavioral tests are interesting to investigate only one cluster of animals will be used, if 4 or more behavioral tests will be executed we will have to multiply the number of animals by two as described in the previous animal procedures, totaling 28 animals per group (see table 10). This is because we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor. ...”

**2) In de bijlage dierproeven 3.4.4.2 geeft u aan één ‘residentmuis’ per testmuis te willen gebruiken, dus net zoveel residentmuizen als testmuizen nodig te hebben. Kunt u onderbouwen waarom u de residentmuizen niet kunt hergebruiken, verwacht u dat alle 720 testmuizen tegelijkertijd worden getest? In het kader van mogelijkheden tot vermindering verzoeken we u om hierop te reageren.**

Wij zijn het eens met de Centrale Commissie Dierproeven dat in het kader van vermindering de residentmuizen kunnen hergebruiken. Van tevoren kunnen wij echter niet voorspellen hoe de residentmuizen zullen reageren op een langere periode van de introductie van testmuizen. Wij denken wel dat elke residentmuis voor twee experimenten kan worden gebruikt, hierdoor kan het aantal residentmuizen worden gehalveerd naar 360. Dit komt neer op een totaal aantal dieren van 1080 in DAP 2.

Omdat wij niet zeker zijn hoe de residentmuizen zullen reageren op meerdere weken gebruikte te worden voor het experiment kunnen wij op dit moment het aantal muizen niet nog verder naar beneden brengen.

In de [dierexperimentele procedure 2](#) hebben wij het aantal dieren aangepast. Ook in de [niet technische samenvatting](#) hebben wij het aantal dieren aangepast van in totaal 4260 naar 3900 muizen.

De volgende tekst is toegevoegd aan DAP2 sectie B1: **“The number of residents required for this experiment is half of the number of intruders described above (see table 5). Only half of the animals is necessary because we expect that we can use the resident mice in two separate experiments. However, we will ensure that** each intruder see a different resident every time to avoid recognition between the animals.”

**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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Unraveling the underlying mechanisms of depression

## 2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training
-----	---	--

---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Currently, depression is thought to be caused by an interaction from the environment (stress) and (genetic) predispositions of the individual. Whilst the exact mechanism is not known, it is known that there is a higher risk of developing depression when more stressful life events have occurred (Brown & Harris, 1978, Nemeroff and Vale 2005). Numerous human and animal research show that adverse life events or stress are undoubtedly one of the major risk factors for the development of depression (McEwen 2003, De Kloet et al. 2005, Nemeroff and Vale 2005, Joëls and Baram 2009, Schmidt 2011, Morava and Kozicz 2013). A stressor is something that challenges the individual and is in conflict with the individual's homeostasis. It can be either external or internal, and physical or psychological (Chrousos and Gold 1992, McEwen 2003, De Kloet et al. 2005). In order to maintain homeostasis, the individual must challenge the stressor; one way to do this is by generating the so-called stress response. The best-known and characterized stress response system is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis. In this system, upon a challenge, corticotropin-releasing factor (CRF) is released, which via the pituitary gland activates the adrenal glands to release corticosteroids. The released mineralo- and glucocorticoids mediate various important physiological adaptive processes. These adaptive processes involve the recruitment of multiple brain areas and complex brain networks (De Kloet et al. 2005, Pittenger and Duman 2008, Joëls and Baram 2009, Price and Drevets 2012, McEwen et al. 2015). Depending on the stressor, different parts of these networks are recruited that will coordinate different physiological, neuroendocrine, and behavioral aspects of the stress response (Joëls and Baram 2009, Krishnan and Nestler 2010, Morava and Kozicz 2013). If one or more of the stress responsive systems are not functioning properly, the different physiological processes to adequately cope with the stressor cannot be activated properly and the stressor cannot be handled in an adaptive manner increasing the risk to develop depression (McEwen 1998, Brown et al. 2004, De Kloet et al. 2005, Joëls and Baram 2009, Krishnan and Nestler 2010). For example, for over more than two decades it has been known that there is a direct relationship between depression and alterations in the HPA-axis and the CRF system (Nemeroff et al. 1984, Banki et al. 1987, Raadsheer et al. 1994, Bale and Vale 2004, Merali et al. 2004, De Kloet et al. 2005, Pariante and Lightman 2008).

One of the best-known hypotheses for the underlying cause of depression is the monoamine hypothesis. This hypothesis states that a decrease in monoamines, such as serotonin or dopamine, in the synaptic cleft together with environmental factors, such as stress, can be an underlying cause of depression. Most antidepressant medications are based on this theory, and increase the amount of monoamines in the synaptic cleft. Unfortunately, antidepressant treatment alleviates symptoms of depression only after several weeks of medication in only a subset (~50%) of the patient

population (Berton and Nestler, 2006), indicating that there are also other mechanisms involved in the pathology of depression. To develop new therapeutic targets for depression, new concepts and hypothesis are needed described below.

### **The peptidergic hypothesis**

#### *Urocortin 1*

One of such new hypothesis that focusses on the mechanisms underlying the stress response adaptation is the peptidergic hypothesis. This hypothesis postulates that if there is an imbalance in peptides involved in initiating and maintaining the stress response, it could lead to increased susceptibility to stress-related disorders. For over two decades, the HPA-axis, involving the neuropeptide CRF, has been considered the main system for controlling the stress adaptation. However, the identification of two CRF receptors (CRF-R1 and CRF-R2) with distinct ligand binding properties, added a new dimension to our view on stress adaptation. Moreover, the discovery of new members of the CRF neuropeptide family, urocortin 1 (Ucn1), urocortin 2 (or stresscopin-related peptide), and urocortin 3 (or stresscopin) has provided important insights into stress adaptation pathways and suggests that stress adaptation involves more systems than the HPA-axis alone (Steckler and Holsboer 1999, Bale and Vale 2004, Joëls and Baram 2009, Vaughan et al., 1995, Hsu and Hsueh, 2001, Lewis et al., 2001, Reyes et al., 2001, Janssen and Kozicz, 2013). Ucn1 is most abundantly expressed in the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (EWcp) (Kozicz et al., 1998; Bittencourt et al., 1999). It has been shown that Ucn 1 is involved in different behaviors such as the suppression of food and water intake (Spina et al. 1996, Jones et al. 1998, Smagin et al. 1998, Coste et al. 2000, Skelton et al. 2000), alcohol drinking (Ryabinin et al. 2012), social behavior (Sajdyk et al. 1999, Skelton et al. 2000) as well as in the stress response, depression, and anxiety (Moreau et al. 1997, Jones et al. 1998, Skelton et al. 2000, Gaszner et al. 2004, Kozicz 2007, Rotzinger et al. 2010, Kormos and Gaszner 2013). Furthermore, in humans it has been found that UCN1 mRNA is up-regulated in brain samples of male, but not female, suicide victims compared to non-depressed controls (Kozicz et al. 2008, Kormos and Gaszner 2013). In addition, these Ucn1 neurons are recruited by various acute stressors and their messenger RNA expression is up-regulated by acute pain and restraint stress (Kozicz et al., 2001; Cunha et al., 2007; Spencer et al., 2012). Our recent data and research by others indicate that an important role in stress adaptation is played by Ucn1 from the EWcp (Gaszner et al., 2004; Korosi et al., 2005; Cunha et al., 2007; Kozicz, 2007).

#### *Orexin*

Another family of peptides that seems involved in the stress response are the orexins, also known as the hypocretins, consisting of orexin-A and orexin-B. These peptides are synthesized solely within the lateral hypothalamus and adjacent regions (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). They bind to two G-protein-coupled receptors, orexin receptor-1 (OXR-1) and orexin receptor-2 (OXR-2) (Sakurai et al., 1998). Several observations suggest that the orexins modulate behavioral state and state-dependent processes. For example, narcolepsy is associated with a decreased concentration of orexin in the cerebrospinal fluid, as well as the number of orexigenic neurons is reduced (Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Furthermore, intracerebroventricular administration of orexin-A or -B increases time spent awake as well as behaviors typical of spontaneous waking and/or stressful, high-arousal conditions, activate the HPA-axis, as well as activates CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala (Kuru et al., 2000; Al-Barazanji et al., 2001; Samson and Taylor 2001; Sakamoto et al., 2004). Orexins are also involved in feeding behavior, the reward system, and the stress response (Sakurai et al., 1998; Kunii et al., 1999). Most of these functions are disturbed in depressed patients, indicating that orexin may be involved in depression. Indeed, several studies found a dysregulation of the orexinergic system in depressed patients (Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). Also animal research supports the involvement of orexin in depression, different genetic animal models for depression (the Wistar-Kyoto and Flinders Sensitive Line rats) show differences in the orexin system compared to control animals (Allard et al. 2004, Mikrouli et al. 2011, Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). However, how precisely orexins are involved in the pathology of depression is unknown, as in both human and animal research hypoactivity as well as hyperactivity of the orexin signaling is associated with depression and depressive phenotype (Nollet and Leman 2013, Chen et al. 2015). But with

aforementioned evidence it is reasonable to predict that the orexin system plays a role in depression pathology. In addition to this, various brainstem and basal forebrain regions that are implicated in the regulation of behavioral state of stress, including the locus coeruleus, the medial portion of the preoptic area, the paraventricular hypothalamic nucleus, and the EWcp, contain orexin-containing fibers and orexin receptors (Trivedi et al., 1998; Marcus et al., 2001; Peyron et al., 1998; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999). However, the exact mechanisms underlying the involvement of these peptides in behavioral and neuropsychological impairments that are observed in depression remain largely elusive.

### **MicroRNA hypothesis**

As described above, dysregulated or altered peptide expression seems to play an important role in the adaptive stress response and depression susceptibility. In recent years a new player as regulator of peptide expression has emerged, namely microRNAs (miRNAs). MiRNAs are small, 21-nucleotide-long units of noncoding RNA which regulate gene expression post-transcriptionally. A miRNA first binds to a miRNA Silencing Complex (miRISC) after which this complex binds to a specific seed region on the 3' untranslated region of an mRNA. As the complex is bound to the mRNA, the mRNA is either degraded, translation is silenced, or in rare cases stimulated. One miRNA can bind up to hundred different mRNAs and, in addition, each mRNA can contain seed regions for hundreds of different miRNAs. To date, miRNAs have been linked to various processes such as metabolism (Ambros et al, 2008), cellular development, and apoptosis (Magni et al, 2014). Furthermore, different miRNAs are also linked to different diseases such as cancer (DeSano & Xu, 2009), Celiac disease (Magni et al, 2014), viral infections (Timoneda et al, 2014), neurodegenerative diseases (Cogswell et al., 2008; Maciotta et al, 2013), as well as psychiatric and stress related disorders (Kocerha et al, 2015). MiRNAs are potential important players in the development of stress related disorders because of their overall abundance in the brain, the potential regulation of different neuropeptides involved in the stress response, or because of their role in the regulation of various metabolic processes. Our preliminary findings on miR-326 show that this miRNA can directly regulate the Ucn1 peptide. Furthermore, others also have shown different miRNAs targeting e.g. CRFR1, glucocorticoid, and corticosteroid signaling (Kocerha et al, 2015, Haramati et al, 2011), all key mediators of the stress response as described above. Studies done on post-mortem brain tissue from depressed patients have shown changed expression levels of several miRNAs which might play a role in depression, including higher levels miR-1202 (Lopez et al, 2014) and lower levels of miR-135 (Issler et al, 2014). An ongoing, comprehensive study done by our lab on the expression patterns of noncoding RNA in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), amygdala, and prefrontal cortex (Brodmann's area 25) of patients who suffered from depression and who eventually committed suicide, are showing several other interesting miRNAs including miR-34 and miR-127, which have been linked to stress-related anxiety (Haramati et al, 2011) and cocaine-induced plasticity (Chandrasekar & Deyer, 2011), respectively. As our experiment is ongoing, we will further functionally analyse these potential targets before we select several interesting ones for behavioural testing using the methods described in this project. This study should provide us with a list of microRNAs which are- and which aren't differentially expressed in highly stressed suicidal subjects as compared to a control condition. Whilst we are not sure yet which microRNAs will be tested, we will select those based on: a significant, consistent, differential expression in one or all of the brain areas involved, between the stressed- and non-stressed conditions ( $P < 0.05$ ; fold change of at least 1.2; preferentially a similar pattern of expression across brain areas); a similar gene expression of these microRNAs as measured by qPCR in human tissue of these stressed suicidal subjects; possibly similar differential protein expression as measured by luciferase vector assay, should we be able to select a strong regulatory target for the microRNA in question.

### **Suboptimal mitochondrial function hypothesis**

All of the aforementioned processes require a substantial amount of energy mobilization, e.g. the production and regulation of peptides and synaptic plasticity required for a proper stress response. These processes are relative energy expensive processes. If the required amount of energy cannot be mobilized because of genetic defects or because the organism is exhausted, peptide expression and/or synaptic plasticity could be dysregulated. This in turn can lead to an incomplete or failed response to adapt to the stressor, leading to maladaptation. In the brain, most of the energy is

produced by the mitochondria. When mitochondrial function is not adequate for normal daily activities, it causes mitochondrial disorders. Patients with mitochondrial disorder show a 54% lifetime prevalence for depression (Fattal et al. 2007). This is more than two times as high as the incidence in the normal population which is around 20% (Kessler et al., 2003). Also, other studies showed that patients with suboptimal mitochondrial function had a higher incidence for developing depression compared to controls (Suomalainen et al., 1992; Carrozzo et al., 2007; Morava et al., 2006a, b; Koene et al., 2009). This indicates that decreased mitochondrial functioning could be pathological in depression. Furthermore, depressed patients show a decreased mitochondrial functioning in peripheral blood cells (Karabatsiakos et al, 2014). Similar to the monoamine hypothesis, a genetic predisposition in the functioning of the mitochondria together with a stressor may cause the individual to fail to adequately adapt to the stressor and develop stress related disorders such as major depression or anxiety (Morava and Kozicz, 2013). These findings, together with aforementioned required energy mobilization for an adequate stress adaptation, have led to the hypothesis that suboptimal mitochondrial function is involved in the pathology of depression. When not enough energy can be produced because of a decreased mitochondrial functioning, successful adaptation is not achieved and maladaptation may occur that ultimately can lead to stress related disorders such as depression or anxiety. Preliminary findings on mice with decreased mitochondrial functioning show that these animals are more prone to develop depressive behavior when stressed. Also immunohistochemical analysis shows an altered activation of several brain regions involved in the stress adaptation. In order to study this hypothesis a new animal model with decreased mitochondrial function will be used. This animal has a decreased Ndufs4 protein, a subunit of complex I of the mitochondria, because of a gene trap insertion in an early locus of the gene.

As described above, all three hypotheses have an influence on the stress response as well as on depression susceptibility. However, it seems that they also interact with each other. For example, miRNAs have a direct influence on different proteins such as Ucn1 (Aschrafi et al. 2015). Also the different described proteins such as Ucn1 (Lawrence et al. 2004, Townsend et al. 2007, Davidson et al. 2009) and orexin (Sellayah et al. 2011) have a direct influence on the mitochondria. A dysregulation of these proteins could also have a direct influence on mitochondrial functioning. In this way miRNAs can also have an indirect influence on the mitochondria by regulating or dysregulating different proteins. However, it has also been found that different miRNAs have a direct effect on the mitochondria (Chan et al. 2009, Chen et al. 2010). If this is also the other way around, that the mitochondria have a direct effect on the described proteins or miRNAs is unclear, this will also be investigated in this project. It seems that these three hypotheses are tightly linked, however what the mechanisms are, what processes are upstream or downstream, and what their influence is on depression symptoms are, is unknown. This project will contribute to unraveling this.

In this project we will also investigate the fact that depression is not only one disease. Depression has many different symptoms (e.g. Criteria A in DSM V) where only 5 out of 9 symptoms are required for the diagnosis depression. The different symptoms are depressed mood or irritable, decreased interests or pleasure, significant weight change or change in appetite, change in sleep, change in activity, fatigue or loss of energy, guilt/worthlessness, concentration, and suicidality. The different animal models will not only be used because they have interacting mechanisms, but also because they can shed light on potential different mechanisms underlying different symptoms of depression. Because only 5 out of 9 symptoms must be present to diagnose depression, there are many different combinations possible resulting in the fact that not everyone have the same symptoms. This can point towards different mechanisms that we can potentially investigate with the different animal models. For example, this way we can investigate if orexin influences the change in weight, appetite or sleep as depression symptoms, or that the mitochondria are underlying the fatigue, loss of energy or a change of activity. Together with the three different stress models we try to elucidate the potential different underlying causes of depression that can explain the different symptoms with different people.

So, despite several decades of research the current knowledge and therapies for the treatment of depression are not yet sufficient. This is largely because the exact underlying mechanisms of depression are still largely unknown. In this project we will test several new hypothesis for underlying

causes of depression, namely the involvement of the peptides orexin and urocortin as well as microRNAs and suboptimal mitochondrial functioning. This will be done using readily available animal models, namely the orexin KO, Ucn1 KO, and Ndfs4 deficient animals, as well as with mice where a specific miRNA expression is altered. This project also utilizes three different kinds of stressors, namely chronic variable stress, chronic social defeat stress, and acute stress. These three stressors are necessary because it is known that physical and psychological stressor have other effects on different individuals and on underlying mechanisms (Lamb 1979, Briski and Gillen 2001, Kavushansky et al. 2009). The chronic variable stress focusses more on the physical and unpredictable component of the stressor while the social defeat stress focusses more on the psychological component of stress. To determine if the initial stress response is different between WTs and the different animal models in this project an acute stressor is used.

Lastly, an intervention study is utilized to test the influence of different antidepressants on depressive behavior in the stressor that gives the most robust effect in each animal model. This experiment will be done using two different classical antidepressants. These antidepressants will be chosen on for example their effect on the mitochondria. It is known that different antidepressants have a different effect on the mitochondria, some will have a positive effect whilst others have a negative effect on mitochondrial function. This intervention experiment will verify and potentially strengthen results found in first three stress experiments. Classical antidepressants are used because they are readily available and widely used, consequently if this research finds promising new results and uses for these classical antidepressants this could faster lead to more personalized health care.

With this project we aim to shed more light on potential underlying causes and mechanisms for depression. Hopefully with the acquired new insight in the aethiology of depression new and more effective treatments can be generated.

### 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?

This project aims to provide several important novel insights in the etiology and biological underpinnings of stress related disorders such as depression using various translational animal models. For example, the involvement of mitochondria in the susceptibility in depression, the involvement of certain microRNAs in the pathophysiology of stress related disorders, as well as the involvement of different peptides such as Ucn1, orexin, and CRF in the stress response and depression susceptibility. In addition to this, possible interactions between these different biological underpinnings will also be investigated as well as how much these could contribute to the pathology of various Category A depression symptoms (DSM V) like fatigue, sleep problems, psychomotor retardation, etc.. The use of novel hypotheses, as outlined in section 3.1, in combination with well-validated models for stress-related psychological diseases with the focus on depression, will help us better understand the underlying mechanisms of stress related psychiatric diseases as well as a better understanding of the various category A symptoms of depression. Consequently, it could also give new insights in identifying novel therapeutic targets and treatment strategies of major depression. In addition, important data will be acquired to better understand fundamental mechanisms contributing to stress adaptation, and consequently will increase our insight into neuronal processes that may underlie unsuccessful adaptation to stress and depression susceptibility. Ultimately, this may lead to the development of new treatment targets or the re-categorization of current treatments which is investigated in experiment 4. In order to investigate the interaction between the above detailed mechanisms in depression vulnerability, the various mechanisms mentioned in the background are



examined in parallel. We will be able to identify different behavioral, physiological, and endocrine aspects of depression that can be correlated/compared to similar parameters in humans giving this project a great translational value.

Similar experiments investigating stress-related disorders were already performed in the past in our lab including experiments with *Ndufs4*def, orexin KO, and *Ucn1* KO mice, giving us experience with these types of experiments. This allows us to work efficiently and with the least amount of distress for the animals. Also, because of this experience and the available knowledge, the main objectives should be achievable and realistic within the duration of the project. This project will be a continuation of the research that has already been performed in this lab towards unraveling the underlying mechanisms of depression. Previous experiments encompass miRNA 326 and *Ucn1* (Aschrafi et al. 2015), orexin and stress (Emmerzaal et al. 2013), *Ucn1* and depression (Kozicz 2007, Spencer et al. 2012), as well as mitochondrial function and depression (Emmerzaal et al. 2015).

---

### **3.3 Relevance**

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

---

It has been estimated that one in five individuals will develop depression in some point in life and in 2010 there were 298 million separate cases of depression recorded globally, with an average duration of 37.7 weeks (Ferrari et al, 2013). At that time depression was the second leading cause of burden of disease worldwide (Ferrari et al, 2013), whilst the World Health Organization (WHO) estimated that depression would be the leading cause of disease by the year 2020. At this moment the WHO reports that depression is the leading cause for disease with worldwide 350 million people suffering from depression of all ages. Depression not only has a profound effect on the individual but also on his/her family and society as a whole. Despite decades of research towards the pathogenic mechanisms behind depression, the neurobiology underlying this complex disorder remains largely elusive. A consequence is that treatment options at the moment remain poor, with up to 40% of patients not responding to current treatment methods (Fava, et al, 1996; Berton and Nestler, 2006; Saad Al-Harbi, 2012). Therefore, understanding the (neuronal) mechanisms underlying fundamental biological processes in adaptation to stressors are of great importance (as the link between stress adaptation and depression indicated in section 3.1). Despite several decades of research that have identified several possible underlying pathologies, progress in understanding depression, and related disorders overall, has been slow and the search for new therapeutic targets and approaches is necessary. In this context, fundamental animal research utilizing well-validated animal models of depression is therefore of great importance to reveal novel mechanisms of stress-related psychiatric diseases that can lead to novel treatment strategies.

---

### **3.4 Research Strategy**

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

---

The main objective of this project is to investigate underlying mechanisms that mediate the behavioral, endocrine and physiological alterations seen in depression, a stress-related disorder. In these experiments the different genes of interest and possible underlying mechanisms described in section 3.1 will be investigated using different animal models. These animals are bred for a specific genetic knockout/knockdown and therefore have a general change in expression of the gene of interest. In these experiments we will be using mice which lack orexin and *Ucn1*. We will also use an *Ndufs4* deficient mouse model to induce a decreased mitochondrial function in these animals. These animals are readily available in our lab. Furthermore, also two different miRNAs will be tested through either lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and

employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The specific miRNA will be chosen after a comprehensive investigation in suicide patients that is ongoing at this moment as described in section 3.1. Using these genetically modified animals, we will aim to investigate whether changes in the expression of these genes or miRNAs, coupled with different methods of stress induction influence depression susceptibility. To investigate depression susceptibility three different stress paradigms will be used, 1) a chronic variable stress paradigm, 2) chronic social defeat stress paradigm, and 3) an acute stress paradigm. 4) After these three experiments an intervention study with different antidepressants will be utilized with the stress model that gives the most robust findings in the animals.

The five different animal models (Ucn1 KO, orexin KO, Ndufs4def, altered miRNA mice) will be used in four different experiments. All these animal models will be used to study the following:

1) Investigate the effect of unpredictable chronic stress on depression susceptibility.

For this experiment the different animal models are subjected to a chronic variable stress paradigm and their depression susceptibility is determined via various behavioral tests and biochemical parameters.

The questions to be answered in this experiment are:

- Is depression susceptibility after a chronic variable stress paradigm influenced by altered peptide levels, mitochondrial function, or miRNA abundance?
- What are the specific effects of these altered parameters on the animals behavior after the stressor?
- What biochemical parameters underlie and influence the potential depression susceptibility?

2) Investigate the effect of social defeat stress on depression susceptibility.

For this experiment the different animal models are subjected to social defeat stress. This will be induced via a resident intruder paradigm.

Depression susceptibility is again determined via various behavioral tests and biochemical parameters.

The questions to be answered in this experiment are:

- Is depression susceptibility influenced by altered peptide levels, mitochondrial function, or miRNA abundance after social stress?
- Are other mechanisms involved in depression susceptibility after social stress as compared to chronic variable stress?

3) Investigating differences during the acute stress response as possible underlying causes for depression susceptibility.

In this experiment the different animal models will be challenged by an acute stressor to determine if the initial stress response is already altered in these animals.

This experiment addresses the following questions:

- Can the potential differences found during the chronic stressors be explained by a difference during the acute stress response?
- Are different acute stress parameters negatively altered in the different animal models?
- Is there a difference in neuronal network activation during the initial stress response?

4) The effect of different antidepressants on reducing depression susceptibility

In this experiment one of the three stressors will be used in an intervention experiment. The animals will be stressed while different groups of animals will receive different treatments. These different treatments are for example based on the effect at the mitochondria.

With this experiment we can address the following questions:

- Can the enhancement or decrease of mitochondrial function by antidepressants influence depression susceptibility?
- Are current antidepressants effective in the treatment of depressive behavior in these different animal models?

### 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.

---

First we plan to investigate the effects of different stressors on depression susceptibility in the different animal models as explained in the previous sections. We will use mice which lack the peptides Ucn1 and Orexin, as well as a new mouse model with decreased mitochondrial function because of a lower Ndufs4 expression. These animals are readily available and present in our lab. To investigate the influence of miRNA abundance we will use specifically engineered viral vectors that can be injected locally, to induce changes in microRNA abundance. To investigate depression susceptibility of these genetically modified animals they will be subjected to three different well validated stress paradigms; 1) chronic variable stress (Pittenger and Duman 2008, Hill et al. 2012, Franceschelli et al. 2014), 2) chronic social defeat stress through a resident intruder paradigm (Kudryavtseva, Bakshantovskaya, & Koryakina, 1991, Rygula et al. 2005), and 3) acute stress (Katz et al. 1981, Fullerton et al. 2004, Bogdan and Pizzagalli 2006).

1) The chronic variable stress model is based on the learned helplessness aspect of stress. The animal is not able to control or predict the stress it will face, due to its unpredictable- and chronic nature. The chronic stress will consist of a variable stress paradigm where for 21 consecutive days a stressor and/or a behavioral test will be presented to the animals. These stressors will be presented in a randomized order where each stressor is presented an equal number of times. The duration of the stressor can be between one hour and an overnight time period. All animals in the stressed group will receive the same stressors.

2) The social defeat stress model is based on stress originating from the experience of aggression and submission. This will be done via a social defeat paradigm. Previous research has shown social defeat stress to be a viable animal model for depression, that induces a depressive phenotype (Kudryavtseva, Bakshantovskaya, & Koryakina, 1991; Rygula et al., 2005) and an enduring activation of the HPA axis (Covington & Miczek, 2005; Koolhaas, De Boer, De Rutter, Meerlo, & Sgoifo, 1997).

3) Acute stress will be used to study changes in the initial phase of the stress response that could eventually lead to a depressive phenotype. The stressor can be for example a series of electric foot shocks, restraint, lipopolysaccharide (LPS) injection, or forced swimming.

After each of the aforementioned stress procedures several well validated behavioral tests will be performed in order to investigate normal- and depression-like behavior. Behavioral tests that will be used are for example the Porsolt swim test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, and grip test. In addition to these tests, the animals will be implanted with a telemetry sensor that can measure autonomous functions such heart rate and core body temperature. This gives information about the rhythm and possible autonomous disturbances the animals may have or develop during the stress paradigm. In order to measure brain structure and function in vivo, neuroimaging techniques are used, such as Diffusion Tensor Imaging (DTI), resting state functional MRI (rs-fMRI) and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS). Shortly after the last stressor- and behavior experiments the animals will be sacrificed and biological material will be collected for further histological and biochemical analyses.

4) Lastly, after these three experiments, an intervention study will be done utilising the stress model that gives the most robust findings in the animals. This can differ for the different genetically modified animals. The intervention will encompass two different antidepressants. Different antidepressants will be used because it is for example known that some antidepressants have a positive while others have a negative effect on the mitochondria, possibly influencing depression susceptibility for better or for worse (Klinedinst and Regenold 2015). The choice of the specific

antidepressants will be made after all three stress experiments are executed. At this moment this choice cannot be made because it depends on the obtained results as well as the advances that are being made for different effects, and potentially newly discovered antidepressants.

#### 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

All individual components of this project focus on understanding the influence of the different described peptides, mitochondrial function, and miRNAs on depression susceptibility after stress and the potential interactions between these different mechanisms.

The four proposed animal procedures will be executed in succession with each other (see figure 1). This flowchart will be used for each of the five proposed animal models (orexin KO, Ucn1 KO, Ndufs4 deficient, and two virally injected groups). Between the different animal procedures there will not be a go/no-go evaluation moment.

Each animal procedure is first executed with behavioral testing and biochemical and histological analysis only. After the experiment is completed, there is a go/no-go evaluation moment, if differences are found between WT and genetically modified animals MRI experiments will also be utilized (Figure 1). The same paradigm with behavioral tests is executed before the MRI. If no differences are found no MRI experiment will be implemented (see figure 1) and the next animal procedure can be executed. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS to investigate functional and structural differences between animals in vivo.

Before the start of animal procedure 4, there is another go/no-go evaluation moment. All three animal procedures are evaluated and compared for that specific animal model. The paradigm that gave the most reliable and robust results will be used for the intervention experiment to minimize the number of animals used. **Also, if less than three behavioral tests are interesting to investigate in this experiment we will use only one cluster of behavioral tests and not two clusters as in the previous experiments, thus reducing the number of animals used.**

# Project overview

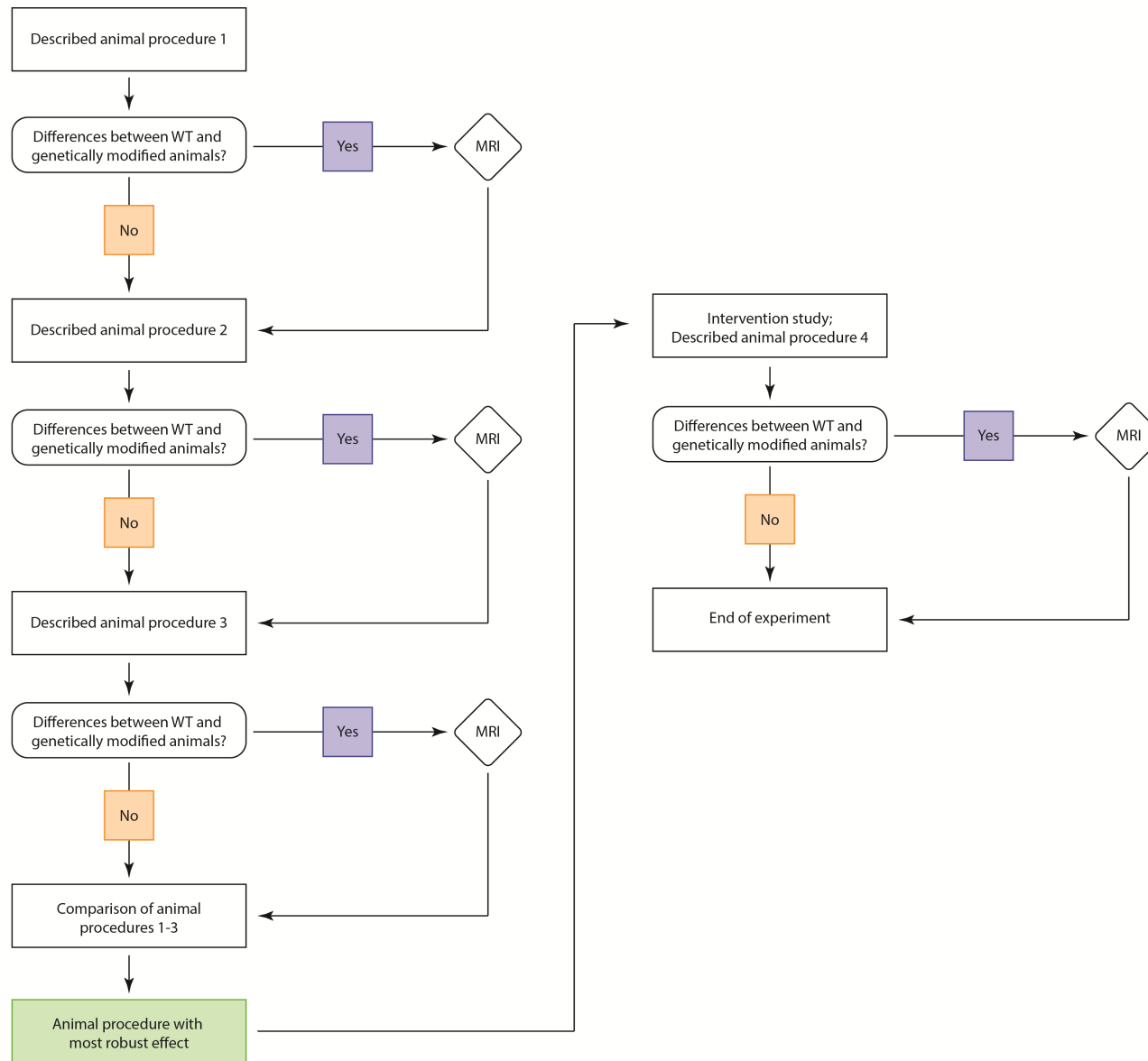


Figure 1: Project overview

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	Chronic variable stress paradigm
2	Chronic Social defeat stress
3	Acute stress paradigm
4	Intervention experiment

**Appendix**  
**Description animal procedures**

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

**1 General information**

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Chronic variable stress paradigm

## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxed' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different above described animal models will be subjected to a chronic variable stress paradigm, a well validated and often used paradigm to induce experimental depressive-behavior in animals. We will assign both the genetically modified animals as well as WT mice randomly to the chronic stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the chronic variable stress group, but without exposing them to the stressor. During and after the chronic stress paradigm mice will be subjected to several behavioral tests to monitor the effect of the chronic stress on the animal's behavior. Different behavioral tests will measure depressive behavior (e.g. novelty suppressed feeding, forced swim test, tail suspension test) as well as well as general behavior such as locomotor activity (e.g. RotaRod, Phenotyper, open field). The weight of the animal will also be measured several times during the paradigm. Shortly after the last stressor or behavioral test the animals will be sacrificed, blood and biological material will be collected, such as the brain, and several other organs. If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.

In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented in the mice. This will both be in WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.



The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary readout parameters will be used because it is known for example body weight decreases, plasma corticosterone increases, and mitochondrial function is altered during the stress paradigm. Furthermore these read out parameters are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If a robust statistically significant difference between the different groups is found, neuroimaging will also be conducted. In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

Our aim is to compare genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) respectively), by exposing them to a chronic stress paradigm. During and after the stress paradigm the animals will be exposed to several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. Mice will randomly be assigned to the either the control group or the stress group.

The telemetry sensor that will be implanted can measure core body temperature and activity. Animals will be operated minimally two weeks prior to the stress induction to allow enough time for the animals to recover. The telemetry sensor will be placed subcutaneous under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation).

The miRNA abundance will be influenced via local viral injections in the brain. The virus will be injected during the same operation as the telemetry sensor implantation to allow enough time for incubation and also recovery from surgery and to reduce discomfort of two separate surgeries. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

The genetically modified animals, as well as the WT littermates, are randomly assigned to either the experimental- or the control condition. Both groups will follow similar protocols, with the only difference that the experimental group will be stressed, and the control group will not receive stress. In this experiment, chronic stress is induced by a chronic variable stress paradigm. This paradigm consists of 21 successive days where each day a stressor and/or a behavioral test is presented to the animal. Each animal in the stress group receives the same stressors and these stressors will be presented in a randomized order where each stressor, mentioned in table 1, is presented an equal number of times (except for the behavioral tests mentioned in the table). The duration of the stressor varies between one hour and an overnight time period, depending on the stressor. The stressors that will be used are for example restraint stress, cold stress, confinement, continuous light overnight, social isolation overnight, soiled cage overnight, shaking stress, cage tilting, overnight food deprivation (for more details see table 1). This paradigm is based upon previously experiments as well as described regimens and is well validated and a proven mouse model for depressive behavior in rodents (Stout et al. 2000, Willner 2005, Deussing 2007, Franceschelli et al. 2014).

Table 1. Different stressors used during the chronic variable stress paradigm. These stressors will be presented to the animals in a randomized order one a day.

<b>Stressor</b>	<b>Average duration</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Confinement	Repeated 1h periods	Animals are placed in a small cage	Moderate
Cold stress	1 hour	Animals are exposed to 4°C	Severe
Continuous light	Overnight	Animals are exposed to continuous light overnight	Moderate
Social isolation	Overnight	Animals are isolated overnight; one mouse/cage. This can be for example combined with an Phenotyper for behavioral analysis	Mild
Soiled cage	Overnight	Bedding material will be soiled with water ( $\pm 250$ ml)	Severe
Shaking stress	1 hour	Cages are placed on an orbital shaker ( $\pm 100$ rpm)	Moderate
Restraint	30 min	Animals are placed in a plastic restrainer	Moderate
Cage tilting	Overnight	The home cage of the animals will be tilted overnight	Moderate
Food deprivation	Overnight	Animals will not have access to ad libitum food overnight	Moderate
Novelty suppressed feeding	10 min	Animals will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle; executed after overnight deprivation	Mild
Porsolt swim test	10 min	Animals are placed in a cylinder filled with water and are forced to swim for 6 minutes	Severe
Tail suspension	10-15 min	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces.	Moderate

At the end of the stress paradigm general and depressive related behavior of the animals will be analyzed with several different behavioral experiments. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 2. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 2. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

On the 21st day, shortly after the last behavioral test, the animals will be sacrificed and blood will be taken. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistically significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the behavioral test with the most variation (FST) from previous experiments. The effect size was  $d = 0.982$ , giving a minimal number of animals of 14 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 14 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the stress paradigm. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

## B. The animals

---

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

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and *Ndufs4* deficient (*Ndufs4def*) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the new *Ndufs4def* mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable chronic variable stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. We need a minimum of 14 animals per group, however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 28 animals per group (see table 3). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 14 animals per group, for details see table 3.

**Table 3. Maximal number of animals necessary**

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
Ucn1 KO / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
Ndufs4def / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
MIRNA 1 / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
MIRNA 2 / WT	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	180
<b>Total</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>900</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	900	Adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

##### *Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

##### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

##### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related psychopathology, and although it uses a chronic stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

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



We are aware that chronic stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Non-applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

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

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

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the chronic stress paradigm we will not apply anesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

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

---

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

---

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, a chronic stressor has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to chronic stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful will be implemented in the chronic stress paradigm to monitor their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The chronic variable stress paradigm is a widely used approach to investigate stress adaptation and stress associated disorders such as depressive behavior. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behavior (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the chronic stress paradigm or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished well being. If an animal during the

experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressors and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature whereby the incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. Based upon our previous experience with similar experiments with the Ucn1 KO mice, we expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience at the end of the chronic stress paradigm and behavioral tests is considered severe. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to chronic stress is severe; for control mice this cumulative discomfort will moderate or severe, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The discomfort severity of the control mice depends on the cluster of behavioral tests, if the cluster includes the Porsolt swim test it will be severe (50% of the control animals), if not and it includes the tail suspension test it will be moderate (50% of the animals). In total, 75% of the animals will experience severe discomfort and 25% of the animals will experience moderate discomfort.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without

these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Chronic Social defeat stress</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Chronic Social defeat stress
Serial number	Type of animal procedure					
2	Chronic Social defeat stress					

## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different animal models will be subjected to a chronic social stressor by using the well-validated Resident-Intruder paradigm, which uses repeated aggressive confrontations to induce social defeat. The animals will be subjected to a 10-day period of daily confrontations, followed by a social dominance test. Previous research has shown social defeat stress to be a good animal model for depression, whereby not only depressive behavior is induced (Kudryavtseva, et al., 1991; Rygula et al., 2005), but also a robust enduring activation of the HPA axis (Covington & Miczek, 2005; J M Koolhaas et al., 1997). We will assign both the genetically modified animals as well as WT mice randomly to the social defeat stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the chronic stress groups, but these mice will be introduced to a non-aggressive mouse strain. To prevent the stress of confrontation, the cage will be fitted with a barrier to allow the animals to smell, see, and hear each other, however which will prevent the actual interaction. After the stress paradigm mice will be subjected to several behavioral tests to monitor the effect of the stress on the animal's behavior.

If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.

Different behavioral tests will focus on depressive behavior in these animals. Also general behavior such as locomotor activity will be tested (e.g. RotaRod, Phenotyper, and Open Field). The weight of the animal will also be measured several times during the paradigm. Shortly after the last behavioral test the animals will be sacrificed, blood and biological material will be collected, such as the brain, and several other organs. In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented. This will both be WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary readout parameters will be used because it is known for example body weight decreases, plasma corticosterone increases, and mitochondrial function is altered during the stress paradigm. Furthermore these read out parameters are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If a robust statistically significant difference between the different groups is found, neuroimaging will also be conducted. In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

Our aim is to compare genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) respectively), by exposing them to a chronic social defeat paradigm followed by several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. Mice will randomly be assigned to the either the control group or the stress group.

The telemetry sensor that will be implanted can measure core body temperature and activity of the mice. Animals will be operated minimally two weeks prior to the stress induction to allow enough time for the animals to recover. The telemetry sensor will be placed subcutaneous under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation).

The miRNA abundance will be influenced via local viral injections in the brain. The virus will be injected during the same operation as the telemetry sensor implantation to allow enough time for incubation and also recovery from surgery and to reduce discomfort of two separate surgeries. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

The genetically modified animals, as well as the healthy WT littermates, are randomly assigned to either the experimental- or the control condition. Both groups will follow similar protocols, with the only difference being that the experimental group will be introduced to very aggressive BALB/cJ mice while the control animals will be introduced to C57BL/6J mice. The control mice will be in the same cage as the resident and while the mice are being able to see, hear, and smell each other they are not able to have physical contact. Over a ten day period the animals will be introduced daily to



a different resident. Our particular confrontation protocol is similar to DEC-nr.: 2013-235, and the protocol by Koolhaas et al (2013). Animals will be in each others' presence for no longer than 10 minutes (attack latency), in which the attacks can take place. An session will last no longer than 5 minutes after the first attack.

At the end of the stress paradigm general and depressive related behavior of the animals will be analyzed with several different behavioral experiments. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 4. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 4. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

Afterwards blood samples will be acquired and the animals will be sacrificed whereby the method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood plasma, and several other organs will also be collected for additional analysis.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the test with the most variation from previous experiments. The effect size was  $d = 1.05$ , giving a minimal number of animals of 12 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 12 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the social stress paradigm. During the social stress paradigm residents/intruders will be mixed constantly in a way that residents and intruders will never be confronted twice with each other to avoid recognition. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. These considerations will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

---

## **B. The animals**

---

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

---

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

To induce chronic stress through a social defeat paradigm two main groups of animals are needed: a group of residents and a group of intruders (the animals of interest, including the below described genetically modified animals). The residents are required to be more aggressive and dominant than the intruders, in order to induce a stable level of stress and social defeat. BALB/cJ mice will be used as residents, besides being slightly bigger compared to the C57BL/6J mice, they are also more aggressive (Fairless et al., 2012, Velez, et al., 2010). Besides the aggressive BALB/cJ mice, we will use WT littermates as non-aggressive normal behaving animals as a control condition.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and *Ndufs4* deficient (*Ndufs4def*) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the *Ndufs4def* mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect of 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable chronic social defeat stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. We need a minimum of 12 animals per group, however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 24 animals per group (see table 5). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per

animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

**The number of residents required for this experiment is half of the number of intruders described above (see table 5). Only half of the animals is necessary because we expect that we can use the resident mice in two separate experiments. However, we will ensure that each intruder sees a different resident every time to avoid recognition between the animals.**

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 12 animals per group, for details see table 5.

Table 5. Maximal number of animals necessary

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
Ucn1 KO / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
Ndufs4def / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
MiRNA 1 / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
MiRNA 2 / WT	24 / 24	24 / 24	12 / 12	12 / 12	144
<b>Total</b>	<b>120 / 120</b>	<b>120 / 120</b>	<b>60 / 60</b>	<b>60 / 60</b>	<b>720</b>

	WT	BALB/cJ	WT	BALB/cJ	
Residents	120	120	60	60	360
<b>Total:</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>1080</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	1080	Adult

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### *Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related psychopathology, and although it uses a chronic stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

---

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

We are aware that chronic social defeat stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## **Repetition and Duplication**

### **E. Repetition**

---

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



## **E. Repetition**

---

Non applicable

## **Accommodation and care**

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

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

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

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

---

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

**H. Pain and pain relief**

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the social defeat paradigm we will not perform anesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

---

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

---

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

---

Stress and single housing of the residents will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, a chronic stressor has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. . During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to social defeat stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful are executed after the resident intruder paradigm to determine their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The stressors' nature is non-invasive, and duration will be strictly monitored, in order to minimize physical- and mental distress, whilst still being able to induce differences between treatment groups. We have selected a maximum time of each separate confrontation (10 minutes), with a maximum of 5 minutes after the first attack. Also, we will make sure that no excessive physical harm is done; we will separate animals and terminate the confrontation prematurely if we deem the risk of excessive physical harm too high. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the chronic stressor or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, large open wounds, other extreme physical harm, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature, whereby we will closely monitor the attacks, perform proper wound care, and make sure the animals eat well. The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. We expect to have less than 5% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the intruder's point of view in the resident intruder paradigm is considered moderate to severe, depending on the resident they will face. The effect of the behavioral tests is expected to be mild or severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to the aggressive Balb/cJ mice (50%) in combination with the behavioral tests is severe; for the intruders which will face the C57BL/6J mice this cumulative discomfort will be moderate to severe depending on the behavioral tests used. The discomfort for the residents will be moderate, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The mice that will face the C57BL/6J mice and receive the Porsolt swim test will have severe discomfort (50%) while the animals that face the C57BL/6J mice and do not receive the Porsolt swim test will have moderate discomfort (50%). In total, 37.5% of the animals (including both residents and intruders) will experience severe discomfort and 62.5% of the animals will experience moderate discomfort.

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Acute stress paradigm</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Acute stress paradigm
Serial number	Type of animal procedure					
3	Acute stress paradigm					

## 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.

---

Different animal models will be used in order to study whether altered protein expression, and/or decreased mitochondrial function can affect depression susceptibility. The protein expression is either constitutively altered (orexin KO and Ucn1 KO mice) or can be influenced with miRNAs. Orexin KO and Ucn1 KO mice are readily available and used in this project because these proteins have been shown to be involved in depression susceptibility as described in section 3.1 of the project proposal and also to continue previous research in our lab. Urocortins 2 and 3 will not be used in this project because although they are paralogous to each other and are part of the CRF family, they are distinct from CRF and urocortin 1 (Rotzinger et al. 2010). The specific miRNAs of interest will be determined after the comprehensive study mentioned in section 3.1 of the project proposal is finished, as of now miR-34 and miR-127 seem promising targets. When the miRNAs of interest are determined they will be influenced either through lenti-/adeno-viral injections or through specific 'floxing' of animals and employing Cre-Lox recombinase to induce cell/tissue specific knockdowns of miRNAs. The actual choice will depend on the gene/microRNA in question, and whether there is a 'floxed' animal model available. To investigate the influence of decreased mitochondrial functioning on depression susceptibility a new mouse model with a gene trap insertion in the Ndufs4 allele will be used. This genetic alteration results in a premature termination of the coding sequence and deficiency of the NDUFS4 protein. This deficiency results in a decreased mitochondrial complex I and III activity of the electron transport chain, but the animals behavior remains normal under basal conditions.

The different animal models will be subjected to an acute stressor to investigate the immediate susceptibility to depression. Acute stress will be induced by using one of a variety of well-validated methods, all animals in the same experiment will receive one and the same stressor. We will assign both these genetically modified animals as well as WT mice randomly to the acute stress or control group. Control mice will be exposed to similar conditions compared to mice in the acute stress group, but without exposing them to the stressor. On these different animal models several behavioral tests will be executed after the stressor. After the last behavioral test, the animals are sacrificed and several biochemical and histological analyses will be performed. If robust changes are found, these studies are followed up by magnetic resonance imaging (MRI) to study brain structure and function, including DTI, rs-fMRI, and MRS. The neuroimaging will be executed on a different group of animals because it is known that isoflurane, that is used to anesthetize the animals, has an influence on mitochondrial function and on the stress response parameters. These animals will also undergo the different behavioral tests.

In order to determine the effect of the stressor on autonomic functions in the different animal models such as body temperature, as well as overall activity and sleep patterns, a telemetry sensor that can measure these will be implemented. This will both be WT as well as genetically modified animals. The sensor will be implemented in these animals minimal two weeks before the stress procedure in order for the animals to recover from surgery. In this time period it will also be possible to set a baseline for each animals before the stress experiment.

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or

**Table 6. Short descriptions of acute stressors that can be used.**

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
<b>Porsolt swim test</b>	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	<b>Severe</b>
<b>Electrical foot shocks</b>	The animals are placed in a skinner box where they will receive a series of inescapable unpredictable foot shocks with a duration of 20-30 min.	<b>Severe</b>
<b>Physical restraint</b>	The animals are placed in a plastic restrainer for 30 min to 1 h	<b>Moderate</b>
<b>Tail suspension</b>	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes.	<b>Moderate</b>
<b>LPS injection</b>	The animals will receive an intraperitoneal injection with lipopolysaccharide (for example E. Coli 055) to elicit an immune and stress reaction	<b>Moderate</b>

Table 7. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate



Shortly after the last behavioral test the animals will be sacrificed. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size was based and calculated using standard deviations from the test with the most variation from previous experiments. The effect size was  $d = 1.017$ , giving a minimal number of animals of 11 per group. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 11 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly besides the stress paradigm. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the experimental- or control condition. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences.

---

## **B. The animals**

---

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

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and Ndufs4 deficient (Ndufs4def) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the Ndufs4def mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

Previous studies and experience in our lab using comparable acute stress-paradigms have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. This allows us to select the minimum of 10 animals per group however, we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor/non-stressor and we aim to do 4 to 6 behavioral tests. Therefore another group of animals has to be added for the additional behavioral tests, totaling at 20 animals per group (see table 8). The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of 10 animals per group, for details see table 8.

Table 8. Maximal number of animals necessary

Animal model	Number of animals per group				Total
	No-MRI		MRI		
	Control	Stress	Control	Stress	
Orexin KO / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
Ucn1 KO / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
Ndufs4def / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
MIRNA 1 / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
MIRNA 2 / WT	22 / 22	22 / 22	11 / 11	11 / 11	132
<b>Total</b>	<b>110 / 110</b>	<b>110 / 110</b>	<b>55 / 55</b>	<b>55 / 55</b>	<b>660</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	660	Adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

---

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

---

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

---

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

---

##### *Replacement.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

##### *Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

##### *Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The model we chose is one of the best validated animal models for stress-related psychopathology, and although it uses a acute stress exposure, it results in relative mild/moderate physical and psychological distress/harm compared some other stress-paradigms. The behavioral tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioral changes. Viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order to minimize animal suffering. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

---

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

---

We are aware that acute stress causes discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to

minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Non applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

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

---

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

---

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

**Classification of discomfort/humane endpoints****H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During viral injections, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation. Otherwise no anesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

During the acute stress paradigm we will not perform anaesthesia or analgesia. When mitochondrial function will not be tested, and when perfusion will be used as a means of sacrifice, animals are first anesthetized by means of 1.5% isoflurane inhalation.

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

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

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

---

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, acute stress has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to acute stress, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful will be executed after the stressor to analyze differences in behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The stressors' nature is non-invasive, as well as relatively short (acute), in order to minimize physical- and mental distress, whilst still being able to induce differences between groups. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the acute stressors or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or

veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor, as well as the relatively short duration, and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The stressor is of a non-invasive nature, whereby the duration is not long enough that we expect severe stress to occur. The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments. Based upon our previous experience with similar experiments with the orexin KO and Ucn1 KO mice, we expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the acute stress paradigm is considered to be moderate or severe, depending on the particular stressor. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals subjected to acute stress in combination with the behavioral tests is moderate or severe; for control mice this cumulative discomfort will be moderate or severe as well, as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU. The severity of the discomfort depends on the stressor/behavioral test used, if the Porsolt swim test or electrical foot shocks are used it will be severe, if not and if the other stressor/behavioral tests the discomfort will be moderate. We expect that about 65% of the animals will experience severe discomfort and about 35% to have moderate discomfort.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without



these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Intervention experiment</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Intervention experiment
Serial number	Type of animal procedure					
4	Intervention experiment					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The general design of this experiment is similar compared to the former three experiments. The same animal models will be used in order to study depression susceptibility with altered protein expression, either constitutively, via miRNA intervention or through specific floxing, and/or a decreased mitochondrial function. In this experiment the animals will be treated with different antidepressants. It has been known that different antidepressants have different side effects on for example mitochondrial functioning, some antidepressants can have a positive effect whilst others have a negative effect (Klinedinst and Regenold 2015).

The specific stress model that will be used in this intervention experiment depends on the effects observed from the former three experiments in this project. The stress model will be chosen after these experiments are finished. The stressor that yields the most robust effects on behavioral, biochemical, and immunohistochemical parameters will be used in this experiment. For the different animal models, different stress paradigms might be best suited to elicit depressive behavior or robust biochemical changes. For example, one animal model will give the best results with the chronic variable stress paradigm while another might give the best result to the social defeat stress. Animals will be exposed to the stress paradigm while being treated (with either treatment or vehicle).

The primary readout parameters will be the behavior of the animals in the different behavioral tests as well as the body weight, adrenal weight, and measurements of several biochemical parameters such as plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels, abundance of several proteins and/or mRNA in the brain, and mitochondrial function. These primary read out parameters are used because they are well-validated markers for depressive behavior, widely used, and easily measured. If these readout parameters establish a robust effect, neuroimaging will also be conducted. At the end of the experiments, behavioral data will be correlated to the biochemical data as well as neuroimaging data on brain structure and function (if neuroimaging is performed). In order to correlate biochemical, behavioral and neuroimaging data to each other the animals that undergo neuroimaging will also be behaviorally tested.

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

---

The aim of this experiment is to compare the genetically modified- or virally injected animals to WT littermates (non-genetically modified or control virally injected (injected with a virus containing a scrambled target sequence) target sequence respectively), by exposing them to a stressor followed by several standard behavioral tests devised to measure depression-related behavior. In addition to the stressor, in this experiment part of the animals will receive an antidepressant treatment. Two different antidepressants will be used depending on their effect on the mitochondria as

described above, as of now lithium chloride and fluoxetine would seem the bests to test at this moment. Animals will randomly be assigned to either the treatment or non-treatment group and all animals will be stressed.

Antidepressants will be given via a so called micro-osmotic pump. This is a small capsule that is inserted subcutaneous containing either an antidepressant or solvent. This method will be used because, although it includes surgery, it is less stressful for the animals compared to daily oral administration. At least a week before the stress paradigm, animals receive the micro-osmotic pump with either an antidepressant or solvent. This procedure will be done under general anesthesia (1.5 – 2% isoflurane inhalation) and the micro-osmotic pump will remain in the mouse for the duration of the experiment.

The animals that will receive a local viral injection will receive this in the same surgery as the micro-osmotic pump implantation. The viral injection is done while the animal is placed in a restraint / stereotactic apparatus, whilst the viral construct can be delivered through a thin syringe and needle.

After the surgery the animals will be subjected to either an acute stressor, a chronic stress paradigm, or social defeat stress, depending on the results from the representative experiments. The stress paradigm (and thus treatment period) that will be used is based upon the results of the previous experiments. This will also include several behavioral tests which measure behavior of the animals. For example the Porsolt swim test, tail suspension test, sucrose preference test, novelty suppressed feeding, open field test, Rotarod, splash test, and grip test. The behavioral tests that have a higher discomfort for the animals, Porsolt swim test and tail suspension test, will not be executed on the same animal. These two tests will be executed with two other milder behavioral tests. Short descriptions of these tests are included in table 9. Each behavioral test is executed once at the end of the stress paradigm.

Table 9. Short description of the different behavioral tests used.

<b>Behavioral test</b>	<b>Short description</b>	<b>Discomfort level</b>
Porsolt swim test	The animal is placed in a cylinder filled with water and is forced to swim for 6 minutes. The time the animals are inactive, i.e. not trying to escape is measured. This test can also be used as a stressor.	Severe
Sucrose preference test	In this test the animal will be faced with two bottles of water, one contains a sucrose solution whereas the other contains plain tap water. The ratio between drinking sucrose water and plain water is measured	Mild
Novelty suppressed feeding	The animal will be placed in a novel environment where a food pallet is placed in the middle. The time to approach and eat from the pallet is measured. This test can also be used as a stressor.	Mild
Open field test	The animal is placed in a novel environment where the general behavior is measured, e.g. locomotion speed, thigmotaxis, time spent in different quadrants, grooming behavior.	Mild
Rotarod	The animal is placed on a rotating drum in order to measure locomotor function. The time the animal spent on the drum before it falls off is measured.	Mild
Grip test	The animal is allowed to grab a metal grid or a triangular pull bar while being pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the grid or the bar just before the animal loses grip is recorded and measured.	Mild
Splash test	In this test the dorsal coat of a mouse is squirted with a 10% sucrose solution. The grooming behavior is recorded as an index of self-care and motivational behavior.	Mild
Tail suspension test	The animals are suspended by their tails with for example tape, in such a position that it cannot escape or hold on to nearby surfaces. Duration 10-15 minutes. The behavior of the animal trying to escape is measured.	Moderate

Shortly after the last behavioral test, the animals will be sacrificed. The sacrificing method is selected depending on post mortem experiments. If immunohistochemistry will be used the animals will be sacrificed by means of transcardial perfusion with phosphate buffered saline, if mitochondrial biochemical assays will be used the animals will be sacrificed by means of cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as mitochondrial respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential, and ATP/ADP levels. The brain, blood, and several other organs will also be collected for additional analyses.

If clear and statistical significant behavioral and/or brain immunohistochemical or biochemical differences between groups emerge from these experiments, MRI experiments will be performed on a new group of animals to investigate brain structure and function. The MRI protocol includes DTI, rs-fMRI, and MRS and will be executed after the stress paradigm. Also one cluster of behavioral tests will be executed on these animals to correlate brain structure and function with behavior of the animals. These mice will be anesthetized using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate, breathing rate, and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with warm airflow. Mice will be sacrificed directly after the MRI experiments by transcardial perfusion or through cervical dislocation while the mice are still under general anesthesia. The total MRI procedure is approximately two hours per animal.

---

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

---

To determine the minimal number of animals needed a G\*Power calculation was employed with  $P < 0.05$  and a Power of 0.80. The effect size depends on the stressor that will be used during this experiment to be determined at a later time point. If the chronic variable stress paradigm will be used the effect size is  $d = 0.982$ , giving a minimal number of animals of 14 per group. This example is chosen because this will then also be the maximal number of animals needed in this experiment, for the other stress paradigms fewer animals will be necessary. This calculation is applicable for all animal models in this project. Examination of previous work done with this specific paradigm, ruled out potential factors that would increase the population size, such as lethality and learning curve in animals.

The effect size for the MRI experiments is estimated to be  $d = 1.3$  from previous experiments requiring only 9 animals per group, however because we also will employ the same behavioral tests to these animals the minimum number of animals needed for the MRI experiment would also be 14 animals per group.

Furthermore, all groups will be housed at comparable conditions and treated similarly. Also, both genetically modified animals as well as WT littermates will randomly be assigned to either the one of the treatment or control conditions. This will be to strengthen the study design by limiting variation between groups due to experimenter bias and housing influences. In previous studies in our lab we observed that the subcutaneous implantation of the micro-osmotic pumps per se did not cause any mortality or extreme discomfort for the animals.

---

## **B. The animals**

---

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

---

---

We will use mice (*Mus musculus*) in our experiments. We need animals with a complex enough physiology, including a developed nervous system, in order to test our hypotheses. A human test population would prove too heterogeneous in their genetic background, environmental experiences, and for instance the possible prevalence of (undiagnosed) psychiatric disorders. Rodents are the lowest species available that are suitable for our experiments, and also allow some comparison to the human physiology.

Standard C57BL/6J or FVB/NJ as WT control mice will be used (depending on the background of the genetically modified animal tested); they are well studied, documented, and tested in the past, and have been genetically modified with success. Another advantage is the high availability of genetically modified variants of the C57BL/6J and the FVB/NJ mouse strains. We will test three genetically modified animal models; the orexin null mice (orexin KO), urocortin 1 null mice (Ucn1 KO), and Ndufs4 deficient (Ndufs4def) mice. The orexin KO (Mochizuki et al. 2004) and Ucn1 KO (Vetter et al. 2002) mice are both from a C57BL/6J background, whereas the Ndufs4def mice are from a FVB/NJ background. The three genetically modified mouse lines will further deepen our insight into the significance of altered peptide homeostasis as well as decreased mitochondrial function in controlling the adaptive stress response.

In addition to the proposed animals described above, we are also planning to test the effect 2 specific microRNAs. The specific miRNAs will be based on the results of the comprehensive study mentioned earlier in the project proposal. The number of animals needed for each experiment is set to a minimum but still high enough to determine statistical differences.

We will use only male animals because it has been shown that ovarian hormones have a powerful effect on the stress response (Viau and Meaney 1991, Wood and Shors 1998, Ter Horst et al. 2009, Goldstein et al. 2010). Because of this, males with a stable hormonal cycle show less variation compared to females with the fluctuating hormonal cycle. Once we establish our project aims, we will consider to perform similar studies in female animals in a follow up study (for this purpose a new application will be prepared). Animals will be tested in the young adult life phase for we aim to investigate the effects in the adult organism, not during development. Also after puberty the hormonal cycle of the males is stable reducing variation keeping the number of animals to a minimum.

At this point in time it is still unsure what specific antidepressants are the best option for this experiment. This is because first all three experiments must be executed and analyzed to determine the best suitable stressor per animal model. The influence of different antidepressants on mitochondrial function is a new and rapidly changing field of research, some antidepressants have a positive effect on mitochondrial function whilst others have a negative effect. As of now the best options would be to use lithium chloride which have a positive effect on the mitochondria and fluoxetine which have a negative effect on the mitochondria. A third treatment group is the control group where the micro-osmotic pumps will be loaded only with vehicle as a control. Depending on the stressor that will be chosen for this experiment, the maximum number of animals that is necessary is 14 animals per group (if chronic variable stress is used).

Previous studies and experience in our lab using comparable stress-paradigms as well as micro pump injections have shown that lethality can be kept to a bare minimum. Therefore, there will be no need to compensate for any potential deaths during testing. Depending on the stressor that will be used the minimum number of animals per subgroup will be 14. **Depending on the number of behavioral tests that yielded interesting results from the experiment that this intervention experiment is based upon, we might need only one cluster of animals. If 3 or fewer**

**behavioral tests are interesting to investigate only one cluster of animals will be used, if 4 or more behavioral tests will be executed we will have to multiply the number of animals by two as described in the previous animal procedures, totaling 28 animals per group (see table 10).** This is because we do not want to expose each animal to more than 3 behavioral tests post-stressor. The reason for this is that the behavioral tests themselves are stressful and are serious confounds in all stress experiments. The compromise to have three tests per animal is well-accepted to minimize the number of animals on the one hand while on the other hand minimizing the confounding the effect of the behavioral test on stress measures.

If robust changes are found in behavior or biochemical analysis neuroimaging will be used on a separate group of stressed/non-stressed mice. These animals will also be behaviorally tested, however not for all tests previously described. The three behavioral tests that yielded the most robust effects will be used. This necessitates the use of maximal 14 animals per group, for details see table 10.

**Table 10. Maximal number of animals necessary**

Animal model	Number of animals per group						Total
	No-MRI			MRI			
	Stress			Stress			
	Anti-1	Anti-2	Veh.	Anti-1	Anti-2	Veh.	
Orexin KO / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
Ucn1 KO / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
Ndufs4def / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
MIRNA 1 / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
MIRNA 2 / WT	28 / 28	28 / 28	28 / 28	14 / 14	14 / 14	14 / 14	252
<b>Total</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>140 / 140</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>70 / 70</b>	<b>1260</b>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen)	1260	Adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?



---

**C. Re-use**

---

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.*

Research strongly suggests that the human psychopathology cannot be studied in lower vertebrates species, thus the use of rodents and primates has been widely accepted within the scientific community. In vitro studies will provide us with viable targets to test, however in order to accurately predict the mechanics by which these genes function in humans, we will need to test them on other vertebrates first. Rodents represent a useful in vivo model with an intact, functioning neuronal network (neurons, glial cells, vascular system). Rodents are often used to model human psychopathology, there is at the moment and to the best of our knowledge no alternative to the use of rodent animal models to study the stress-adaptation response that is comparable to the human situation.

*Reduction.*

Upon planning the experiments all efforts have been made to minimize the number of animals used in this study. Experience from previous similar experiments and G\*power analysis show that the requested number of mice is the very lowest number of mice that would be needed to test our hypothesis. The limited use of invasive procedures and experience in our lab should minimize lives lost due to procedures, infections, etc. Also, all animals are randomly appointed to the different groups.

*Refinement.*

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. All experiments were designed and will be carried out to minimize the suffering of the animals. The behavioural tests are selected to induce as little stress and suffering as possible, whilst still resulting in reliable data on depression-like behavioural changes. Viral injections, micro-osmotic pump implementation, telemetry sensor implementation, perfusion as a method of sacrifice, and MRI will all be performed under general anaesthesia (via 1.5% isoflurane inhalation) in order

to minimize animal suffering. Also, 3 days post-surgery the animals will receive analgesia. Humane endpoints will be selected, to prevent unnecessary or excessive suffering.

---

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

---

We are aware that stress and the surgery cause discomfort to animals. However, stress induction is inevitable to investigate the neuronal functions and circuitries, as well as other biological processes involved in the stress adaptation and investigate susceptibility to stress related disorders. In order to minimize suffering and number of mice, animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. To minimize pain and distress of the animals during the MRI experiments, as well as during the viral injections, micro/osmotic pump placement, and telemetry sensor implementation, mice will be anesthetized by means of inhalation of 1.5% isoflurane. After surgery the animals will be treated with analgesics to alleviate the initial pain from the wound.

Expertise on the proposed experiments is available as well as required equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least amount of distress for the animals. However, should any animal during the experiment show any sign of an unnecessary large amount of distress, humane endpoints will be implemented. After consultation with a veterinarian or an animal welfare expert the animal will be removed from the experiment and sacrificed to end suffering.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## 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

---

**F. Accommodation and care**

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During viral injections, telemetry sensor implementation, micro-osmotic pump insertion, perfusion as a method of sacrifice, or MRI experiments animals will be anesthetized by means of isoflurane inhalation of 1.5%. Otherwise no anaesthesia will be used, as this will influence any stress response parameters as well as the mitochondrial function. Also, up to three days post-surgery lidocaine will be applied cutaneous as an analgesic.

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

---

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

---

Stress will cause discomfort for the animals. To investigate neuronal circuitries/functions involved in stress adaptation, acute stress has to be applied on a part of the mice. Furthermore, animals will also be subjected to several behavioral tests that leads to distress for the animals. During the MRI procedure and surgery, animals will be anesthetized using 1.5% isoflurane. Side effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in heart rate and blood pressure. When necessary, the level of anaesthesia can be adjusted very rapidly. No other adverse effects are expected.

Explain why these effects may emerge.

---

A group of animals will be exposed to a stressor, which is known to have effects on the welfare of the animals as seen by behavioral changes. The animals will develop distress, which will be visible physically or behaviorally, as has been shown in past studies that used a similar design. Also, behavioral tests that can be stressful are executed after the stress paradigm to determine their behavior. During the MRI protocol as well as surgery, mice are anesthetized with isoflurane, where respiratory depression is not an uncommon side effect.

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

---

The stress paradigms planned in this experiment are widely used in the research towards the stress response and stress related behaviors such as depressive behavior. Besides the stressors inflicted for the experiment, all efforts have been made in order to minimize the suffering of the animals in this experiment. We will house animals together, and provide food and water ad libitum, and keep track of their weight, body temperature, respiration frequency, general health, and behaviour (such as grooming), in order to determine whether the animals experience inappropriate levels of distress. If animals are suffering unnecessarily, we will confer with animal caretakers, the animal welfare expert, and a veterinarian, and apply humane endpoints if necessary.

## **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.

---

Some animals may experience more stress than anticipated for the stressors or have complications from surgery. Animals will constantly be monitored for signs of sickness, infection, excessive weight loss, or other signs of diminished wellbeing. If an animal during the experiment shows a

body weight loss of more than 15%, piloerection, or a significant decrease of grooming, this will be considered as a sign of unnecessary distress. When this is observed, the animal will be removed from the experiment and immediately terminated upon consultation of an animal caretaker and/or veterinarian. Because of the non-invasive nature of the stressor, as well as the relatively short duration, and also based on previous experiments it is unlikely that the humane endpoints will need to be applied.

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of extreme discomfort in the animals is minimal and unlikely, as known from previous similar experiments and experience in our lab with micro-osmotic pump surgery as well as dietary interventions. We expect to have less than 3% of the animals develop these criteria.

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

---

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

---

The discomfort the animals experience from the stress paradigm is considered severe. The effect of the behavioral tests is expected to be mild to severe, depending on the behavioral test. The cumulative discomfort of the animals in this experiment is severe (100%) as is classified in Annex VIII of the Directive 2010/63/EU.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

After the experiment animals are sacrificed in order to study several physiological processes involved in the stress response. For most of these measurements, post mortem biological material is needed. This will be investigated with several biochemical and histological techniques. Without these techniques, we would not be able to determine if the stress and/or genetic modifications have any effects on a cellular and molecular level. This would prevent us from coupling the potential changes in behavior to actual changes in physiology.

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  
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]  
6500 HB [REDACTED] 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  
AVD103002016481  
**Bijlagen**  
1

Datum 18 mei 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Unraveling the underlying mechanisms of depression" met aanvraagnummer AVD103002016481. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 25 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft op de vragen van de CCD gereageerd. In uw antwoord heeft u uitgelegd waarom het wenselijk is om alle gedragstesten te gebruiken in de proeven 3.4.4.1-3.4.4.3 en heeft u aangegeven in dierproef 3.4.4.4 rekening te gaan houden met de uitkomsten uit de vorige proeven. U heeft ook het aantal muizen te gebruiken als resident in dierproef 3.4.4.2 gehalveerd. U heeft uw aanvraag aangepast en een nieuwe versie van de formulieren naar ons toe gestuurd.

Bij de behandeling van uw aanvraag heeft de CCD opgemerkt dat enige voorzichtigheid is geboden bij directe vertaling van gedragsstudies bij dieren naar effecten, zoals depressie, bij de mens.

### **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. De voorwaarde betreffende het afstemmen van de go/no-go momenten met de IvD is gesteld in het kader van de 3V's, om te voorkomen dat dat dieren onnodig worden gebruikt in het geval dat de experimenten niet de verwachte resultaten opleveren. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Unraveling the underlying mechanisms of depression" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2016 tot en met 31 mei 2021. 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 1 sub d 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 waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling op dit advies stelt de CCD twee algemene voorwaarden zoals in de vergunning genoemd.

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.

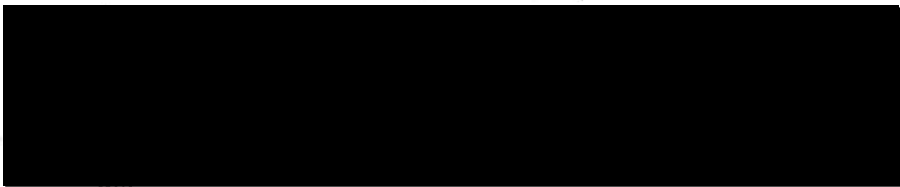
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



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  
Postcode en plaats: 6500HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2016 tot en met 31 mei 2021, voor het project "Unraveling the underlying mechanisms of depression" met aanvraagnummer AVD103002016481, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker in opleiding. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 25 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Chronic variable stress paradigm	Muizen (Mus musculus) / Orexin KO/WT; Ucn1 KO/WT; Ndufs4def/WT; MiRNA 1/WT; MiRNA 2/WT	900	75,00% Ernstig 25,00% Matig	
3.4.4.2 Chronic Social defeat stress	Muizen (Mus musculus) / Gelijk aan dierproef 3.4.4.1 en BALB/cJ	1080	37,50% Ernstig 62,50% Matig	
3.4.4.3 Acute stress paradigm	Muizen (Mus musculus) / Gelijk aan dierproef 3.4.4.1.	660	65,00% Ernstig 35,00% Matig	
3.4.4.4 Intervention experiment	Muizen (Mus musculus) / Gelijk aan dierproef 3.4.4.1.	1260	100,00% % Ernstig	

### **Voorwaarden**

#### **Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2022 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.

#### **Algemene voorwaarden:**

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister 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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

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

Uit artikel 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.



AVD 103002016482  
22 MAART 2016



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10
		Postbus	9101, t.a.v. [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] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 18 . 04 . 2016
- Einddatum 18 . 04 . 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neural synchronization and executive functions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies en factuurinformatie

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 18 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]





### Form Project proposal

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

## 1 General information

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen     |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Neural synchronization and executive functions |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research<br><input type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

### **EXECUTIVE FUNCTIONS AND THEIR IMPAIRMENTS**

Executive functioning refers to the ability to monitor the environment for mistakes, conflicts, or negative performance feedback, and to initiate rapid but flexible action adjustments to optimize goal-directed behavior (Botvinick et al., 2001; Ridderinkhof et al., 2004). "Executive functioning" is a fairly broad term; in our research we focus on a few specific aspects of executive functioning: response conflict, effort-based decision-making, and stimulus-reward association learning.

Impairments in these and related executive functions are disrupted in several clinical disorders including major depression and schizophrenia. Understanding the neural circuitry underlying executive functioning, and how that circuitry depends on neurochemicals such as dopamine and serotonin, may lead to a significant advance in understanding disorders of executive functioning, as well as studying the effects of treatments.

### **THETA OSCILLATIONS IN NEURAL CIRCUITS UNDERLYING EXECUTIVE FUNCTIONS**

Executive functioning relies on a network of inter-connected brain regions, mainly including the prefrontal cortex, parietal cortex, and striatum/basal ganglia (for convenience, this collection of systems will be referred to as the "executive functioning network"). For example, lesions to the medial prefrontal cortex of rats leads to impairments in decision-making and increased impulsivity (Courtière et al., 2007; Walton et al., 2002).

Neural oscillations -- rhythmic fluctuations in the excitability of populations of neurons -- are important markers of neural activity. Theta-band (4-8 Hz) oscillations in the medial prefrontal cortex are strongly associated with executive functioning in humans (see Cohen 2014, for a review). It has been speculated that theta oscillations are used to synchronize brain activity across regions within the executive functioning network, and between this network and sensory processing areas. In other words, it is thought that theta oscillations are crucial for executive functioning, and that understanding the role of theta in executive functioning will lead to advances in understanding healthy executive functioning and impairments in executive functioning in clinical disorders. However, the precise role of theta oscillations is very difficult to study using non-invasive methods in humans. Therefore, rodent models are necessary.

Although people often associate “theta” in the rat with hippocampus and memory, other findings have shown that theta in the prefrontal cortex is independent of hippocampal theta (different frequency, different statistical characteristics, and so on) (Pignatelli et al., 2012). Indeed, there is no unitary “theta function.” In humans it has been demonstrated that theta oscillations in the occipital cortex are different from theta oscillations in the medial prefrontal cortex, which are different from theta oscillations in the hippocampus (Cohen, 2014). In this research, we will focus on theta in the medial prefrontal cortex of rats, and how this theta is used to synchronize neural activity with other brain regions.

### **THE ROLES OF DOPAMINE AND SEROTONIN IN NEURAL CIRCUITS UNDERLYING EXECUTIVE FUNCTIONS**

Executive functioning is modulated by a variety of neurochemicals, with dopamine and serotonin being the most important. Indeed, small doses of dopamine medication (cabergoline, LDopa, etc) change people's stimulus-reward association learning abilities and accompanying functional connectivity between prefrontal cortex and striatum (Cohen et. al., 2007). What is the function of dopamine in executive functioning? There are several prominent ideas, including providing a prediction error signal that guides learning, helping the brain ignore noise to focus on signal, and enhancing synaptic plasticity (thought to be a mechanism for learning and forming associations). We believe that dopamine plays a crucial role by facilitating synchronization in the executive functioning circuit, by boosting plasticity when inter-regional synchronization is present. The roles of dopamine in modulating neural activity in the executive functioning system has traditionally been difficult to study, but new genetic models allow us to control the dopamine system using optogenetic tools, and thus understand the role of dopamine in brain synchronization in ways previously not possible. In particular, we will use Th:Cre rats that can be used in combination with a cre-dependent channelrhodopsin vector to control the dopamine system using light.

Serotonin is also an important neurochemical for executive functioning, in particular with regards to impulsivity and anxiety disorders. It has been demonstrated that a serotonin gene knock-out rat model (5HTT KO) shows altered stimulus-reward association learning and increased impulsive behavior (Nonkes and Homberg, 2013). This gene line has been proposed to be a useful model for studying impulsive characteristics, for example, in ADHD. There is evidence that this model shows impaired medial prefrontal theta oscillations and prefrontal-amygdala synchronization (Narayanan et al., 2011); we intend to replicate and expand this line of work and establish that this KO line is a useful model for studying the executive functioning network, and in particular, its interactions with sensory-processing brain regions.

### **WHAT WE DON'T KNOW**

The non-invasive measurements in humans reflect aggregated activity of millions of neurons; many important hypotheses regarding the roles of theta oscillations in executive functioning simply cannot be tested in humans. Instead, we need direct access to the neural microcircuitry to understand how the integration and transfer of information in the brain supports executive functioning. This research in turn is important to understand how executive functioning is impaired. This is why research on rat models is necessary. More specifically, our research is organized around the following questions:

(1) *Are rats a good model for studying the role of medial prefrontal theta oscillations in the executive functioning network?* The answer is unknown, but it is important because it will help bridge the gap between research on humans and research on rodents. Nonetheless, we are optimistic that rats are indeed a useful model: several executive functioning tasks that are used in humans have been successfully adapted to rats (Courtière et al., 2007; Narayanan et al., 2013; Walton et al., 2002; Friedman et al., 2015) (many of our behavioral tasks are modeled after these published designs), and rats have robust theta oscillations in the medial prefrontal cortex, similar to humans. In other words, rats are an established *behavioral* model

for executive functioning, and oscillations in the rat brain share many characteristics with oscillations in the human brain. The critical link of theta during executive functioning tasks has not been made, and we intend to demonstrate this.

(2) *What is the function of medial prefrontal theta oscillations during executive functioning?* Based on non-invasive research in humans, it has been speculated that theta oscillations are involved in coordinating the activity of individual cells inside the medial prefrontal cortex, in subcortical structures like the striatum and thalamus, and also in sensory-processing regions. These hypotheses cannot be tested in humans, but are readily accessible in rats.

(3) *Is the executive functioning network sensory-modality-specific or modality independent?* Executive functioning has been assumed to be a unitary process in humans (Botvinick et al., 2001), but this assumption has not been directly tested, in part due to difficulties in isolating different sensory processes using EEG, and the inaccessibility of individual neurons, in humans. In humans, functional connectivity between the prefrontal cortex and the visual cortex has been demonstrated (Cohen, 2014), but whether similar patterns exist for other modalities is unknown. Furthermore, the roles of the thalamus and striatum are difficult to study in humans, because EEG cannot measure deep-brain activity with high precision, and fMRI cannot measure electrophysiological activity.

(4) *What is the role of dopamine in synchronization within the executive functioning network, and between this network and sensory processing regions?* The dopamine system is difficult to manipulate in humans, but thanks to new optogenetic tools in rats, we can control this neurochemical system very rapidly and very specifically.

(5) *Do 5HTT KO rats -- which behave impulsively and have altered stimulus-reward associations -- have altered patterns of theta oscillations and associated synchronization in the medial prefrontal cortex?* Establishing this link, in particular with regards to the interactions between the medial prefrontal cortex and sensory-processing regions, will be important for understanding the importance of serotonin transmission in executive functioning.

### **WHY WE ARE DOING THIS RESEARCH**

The result of this research will be a better understanding of how the executive functioning network is able to modulate neural activity in brain regions responsible for sensory processing and cognition. This will be applicable to basic research in interpreting patterns of results seen in human EEG studies. By incorporating stimulation and pharmacology, this research also has important translational and application value. In particular, brain stimulation techniques (transcranial magnetic and electrical stimulation) are increasingly being applied as a treatment option in humans for Parkinson's disease and major depression, among other disorders, and dopamine medications (e.g., LDopa) have long been used to treat psychiatric conditions and movement disorders. Our research will help understand how these manipulations affect neural activity in the brain systems most important for executive functioning.

Therefore, an important component of this research is the application and development of cutting-edge data analysis techniques for characterizing neural activity. We will also make data available to other scientists for further development and analysis. In this way, the data will be used beyond our research, which facilitates the Replacement and Reduction principles of animal ethics. That is, other researchers will be able to use our data rather than acquiring new data in new animals.

## References

- Botvinick MM, Braver TS, Barch DM, Carter CS & Cohen JD. (2001) Conflict monitoring and cognitive control. *Psychol. Rev.* 108, 624–52.
- Courtière A, Hardouin J, Burle B, Vidal F, Hasbroucq T. (2007). Simon effect in the rat: a new model for studying the neural bases of the dual-route architecture. *Behav Brain Res.* 179(1):69-75.
- Cohen MX (2014) A neural circuit for conflict detection and resolution. *Trends in Neurosciences* 37(9):480-90. Sept 25.
- Cohen MX, Donner TH (2013). Midfrontal conflict-related theta-band power reflects neural oscillations that predict behavior. *J Neurophysiology.* 110(12):2752-63.
- Cohen MX, Krohn-Grimberghe A, Elger CE, Weber B. (2007). Dopamine gene predicts the brain's response to dopaminergic drug. *Eur J Neurosci.* 26(12):3652-60.
- Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori K, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM. (2015). A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell.* 2015 Jun 4;161(6):1320-33.
- Narayanan NS, Cavanagh JF, Frank MJ, Laubach M. (2013) Common medial frontal mechanisms of adaptive control in humans and rodents. *Nat Neuroscience.*
- Narayanan V, et al., (2011). Social Defeat: Impact on Fear Extinction and Amygdala-Prefrontal Cortical Theta Synchrony in 5-HTT Deficient Mice. *PloS One.* e22600
- Pignatelli, M., Beyeler, A. & Leinekugel, X. (2012) Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J. Physiol. Paris* 106, 81–92
- Nonkes LJ, Homberg JR. (2013). Perseverative instrumental and Pavlovian responding to conditioned stimuli in serotonin transporter knockout rats. *Neurobiol Learn Mem.* 100:48-55.
- Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A. & Nieuwenhuis, S. (2004) The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* 306, 443–7.
- Walton ME, Bannerman DM, Rushworth MF. (2002) The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci.*;22(24):10996-1003.

## 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?

## The primary purposes of this research are:

(1) *Demonstrate that rats are a feasible model for studying the basic brain mechanisms of human executive functioning.* Rats behave comparably to

humans in executive functioning tasks (at least, simplified ones), and the rat medial prefrontal cortex exhibits strong theta oscillations, similar to the human medial prefrontal cortex. We intend to establish the missing link of theta during executive functioning tasks in rodents.

(2) *Determine how neural oscillations are used to coordinate information processing within the prefrontal cortex and with sensory processing regions.* The role of oscillations has mostly been studied in sensory cortex. We aim to establish that similar principles hold in the executive functioning circuit and its interactions with sensory-processing regions. These mechanisms will be tested via spike-field coherence (e.g., do theta oscillations in the prefrontal cortex control the timing of neurons in sensory cortices?) and spectral coherence (e.g., is population activity in the prefrontal cortex synchronized with population activity in sensory cortices?). Furthermore, we believe that oscillations play a role in allowing the thalamus and striatum to act as "middlemen" to regulate the flow of information between the prefrontal cortex and sensory regions.

(3) *Determine whether the executive functioning circuit has sensory-modality-specific functions or is generic for different sensory modalities.* This is crucial to understanding how "high-level" the executive functioning circuit is.

(4) Determine the role of dopamine in modulating synchronization in the executive functioning network. Dopamine is crucially involved in healthy cognition and impairments in several brain disorders, and understanding its role in synchronization of the executive functioning network is necessary to understand how dopamine medications affect brain function.

(5) Determine whether 5HTT KO rats exhibit impairments in the executive functioning network activity, relative to control animals. This is important for understanding the role of serotonin transmission in executive functioning and learning.

### **Feasibility of the research**

This research is highly feasible. We will use behavioral tasks that have previously been shown to work in rodents (although they have not been combined with stimulation/electrophysiology). Furthermore, the research is developed with the 3 R's in mind; sophisticated experimental techniques will reduce discomfort of the animals while simultaneously increasing the amount of data obtained from each animal.

The research proposed here will be completed by a team of scientists who have previous experience using electrophysiology and optogenetics. Over the next 5 years, there will be several experienced scientists involved in the research, including 3-4 postdocs, 1-2 PhD students, and an animal technician. The proposed research will also benefit from close collaborations within the [REDACTED]. The PI has also written an authoritative textbook on neuroscience data analyses and statistics [REDACTED].

A large portion of this research is funded by an ERC Starting grant entitled [REDACTED]. The purpose of the grant is to make new discoveries regarding the neurobiological origin and functional significance of theta oscillations in the medial prefrontal cortex during executive functioning. This research is also supported by internal funds from the [REDACTED] and by NWO grants (e.g., Veni).

### **3.3 Relevance**

---

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

---

**Scientific relevance:**

There is overwhelming evidence that the executive functioning network is critically important for healthy brain function and for learning associations between sensory information and rewards. But there is too little understanding of the microcircuit dynamics that support these aspects of cognition. The findings obtained in this research will be significant for researchers of human EEG and cognition, and for researchers of animals and computational models. A second scientific impact is that >10 TB of rich, high-quality neurophysiology data will be available to the scientific community, maximizing the knowledge gained from our data, and thus also reducing the number of animals that need to be used to obtain such data in the future.

**Clinical relevance:**

Dysfunction of executive control is implicated in many clinical disorders, ranging from mood disorders (obsessive compulsive disorder, major depression) to motor diseases (Parkinson's disease) to schizophrenia and addiction. It is known that these conditions are associated with aberrant patterns of neural activity and synchronization, but it is less clear what those patterns mean at the neural and circuit level, due to limitations of non-invasive neuroimaging in humans.

On the other hand, medications that are associated with improved executive functioning also alter patterns of neural synchronization. At present, there are no good rodent models for understanding why this is the case. Establishing a rodent model of oscillations and synchronization in executive functioning will provide a foundation for understanding how these networks are affected by disease models, and how efficacious medication improves functioning in these neural circuits.

**Societal relevance:**

Executive functioning is broadly relevant for many aspects of success in our world, ranging from social situations to work promotions to driving a car. The research described here will help understand how these functions are implemented in the brain, which is a necessary step towards understanding how these disregulation in executive functioning contributes to neural disorders.

In summary, that the scientific, clinical, and societal significance of our research outweighs the potential discomfort the animals may experience.

**3.4 Research Strategy****3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).**

---

The research contains three parts that are performed sequentially in each animal, according to the following numbered list, in order.

1. Surgery to implant electrodes and inject viruses. This first part lasts 5-9 hours, depending on the complexity of the surgery.
2. Behavioral tasks focused on key elements of executive functioning, under continuous monitoring of brain electrical activity, and causal interference via optogenetics and electrical microstimulation. This second part lasts up to 18 months or shorter if humane endpoints are reached. This part of the research will provide the data that will be analyzed off-line. The analyses are described in more detail in the Animal Procedures section. Briefly, we will focus on identifying theta oscillations in the medial prefrontal cortex during the behavioral tasks, and how those oscillations are related to neural activity in the prefrontal cortex and sensory areas.
3. Euthanasia and ex-vivo anatomical confirmation of electrode implantation. This third part ends the research for the animal.



### 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.

---

Each animal will undergo the same three procedures in the same order (1-surgery, 2-tasks and recordings, 3-euthanasia). Differences arise in the specific tasks that will be used (in order to focus on different aspects of executive functioning) and specific animal models that will be used (wildtype, serotonin knock-out, dopamine cre). However, these specific aspects do not change the overall flow of the research, nor do they affect the amount of discomfort. Thus, from an ethics perspective and considering the animals' welfare, the entire research can be considered as one experiment protocol that comprises three phases.

#### **Phase 1: Surgery**

Surgery is performed to implant electrodes, cannulae, light fibers, and viruses to measure and modulate brain activity. Electrodes will be implanted to record neural activity from several distinct neural circuits simultaneously. Depending on the element of executive functioning investigated, 1-4 electrodes will be implanted into the brain.

In order to establish causal mechanisms, we will also provide brief stimulation using optical or electrical tools. For this purpose, a light fiber is implanted that will be connected to a light source during the experiment. For measuring extracellular dopamine and to deliver receptor agonists/antagonists, small cannulae will be implanted. After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows for chronic recordings for weeks to months, maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized.

#### **Phase 2: Tasks and recordings**

Adult rats will be tested in different behavior tasks during awake head-fixation (one of the tasks will involve freely moving animals). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for 60-90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, IR cameras and breathing monitors are used to allow behavior and physiology to be monitored for signs of distress.

All behavioral tasks are similar in that they involve learning stimulus-reward associations and behavioral responses from the rats to indicate their learning. Differences among tasks are designed to focus on different aspects of executive functioning, and are described in more detail in the Procedures section. Water and/or food restriction will be used to facilitate training and motivation during the behavioral tasks. Frequent liquid rewards are given during the tasks. We take special care regarding the amount of food/water restriction -- animals should be motivated to perform the tasks, but they should not be stressed or unhealthy. Healthy animals provide high-quality data, and this is obviously something we want to achieve.

#### **Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation**

This is necessary to check the anatomical location of the implantations and expression of the virus (for optogenetics).

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

---

The three phases of the research (surgery, tasks, euthanasia) are necessarily highly related. There is no point in doing surgery if there are no tasks to record data, and we cannot record neural activity during behavior without first performing surgery to implant the electrodes. The procedures we will use reflect the current state-of-the-art in neuroscience. We wish to understand the neural circuit mechanisms of executive functioning and control over sensory processing, and large-scale electrophysiology and interference with optogenetic/electrical microstimulation are currently the best tools for this.

This is fundamental research that is necessary in order for future research to use rats as models for studying diseases of human executive functioning.

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	Description of procedures for surgery and tasks.

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Description of procedures for surgery and tasks.

## 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.

---

#### **PRIMARY OUTCOME MEASURES**

**The primary outcome measure is electrophysiological activity** -- action potentials from individual neurons and local field potentials from electrodes placed in targeted cortical and subcortical regions. We focus on these features because (1) scientific thinking over the past century points to electrophysiological measurements (spikes and local field potentials) as being important markers of local and distributed brain function, and (2) this maximizes the use of the obtained data.

Behavioral performance on the tasks are a secondary outcome measure that will be used to ensure that the animals understand the task and to link to the neural data.

#### **DIFFERENT TYPES OF NEURAL ACTIVITY WE WILL MEASURE**

*Neural oscillations*: Oscillations reflect rhythmic fluctuations in population-level neural activity, and are our primary measure of mesoscopic-scale activity. Dynamics in different frequency bands can be decomposed and isolated using Fourier- and other related techniques. We have considerable expertise in these types of analyses [REDACTED]. Our analyses will focus on theta oscillations, because this will allow us to anchor our findings to the scientific literature on human executive functioning. However, all analyses are done off-line, meaning we can re-analyze the data for other characteristics (e.g., gamma oscillations).

*Action potentials ("spiking")*: Neurons emit brief action potentials that are widely believed to be the primary mode of signaling in the nervous system. Changes in spike rate and timing can be linked to learning and decision-making during the tasks.

*Spectral coherence*: Inter-regional communication in the brain is thought to be facilitated by synchronization, or correlated patterns of oscillatory activity. Obtaining evidence for synchronization requires multiple electrodes in the brain in the same animals. In order to determine whether there is functional connectivity and how it is modulated by the tasks, we will use spectral coherence, an established analysis technique for synchronization between electrophysiological activity in different brain regions.

*Spike-field coherence*: This involves testing whether the firing of single neurons is synchronized with the local field potential oscillations recorded in the same region or between distant regions. Spike-field coherence is one way to measure the extent to which one brain region exerts a bias over processing in another brain region.

#### **ALTERNATIVE OUTCOMES**

It is possible that we not find strong evidence for a role of theta oscillations in executive functioning in rats. Such a result would limit our ability to generalize the findings to humans, therefore suggesting that humans and rats have at least partly distinct neural mechanisms for executive

functioning. In this case, we would continue our research as planned but focus the analyses on the most robust aspects of the findings. In other words, because of the novelty of this research, our findings will provide important insights into neural computations underlying executive functioning regardless of whether our hypothesis regarding the role of theta oscillations is confirmed.

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

---

All animals will undergo the same three phases of the experiment, in the same order (1-surgery, 2-tasks, 3-euthanasia). Different groups of animals will be used to investigate different aspects of executive functioning, but from an ethics/welfare perspective, these differences do not change the amount of discomfort that the animals will experience. Below we describe the details of the procedures that are relevant for animal welfare. In the Phase-2 section below we also list the number of animals per experiment/group.

### **Phase 1: Surgery**

Surgery is performed to implant electrodes and inject viruses to measure and influence brain activity. We follow standard established protocols that increase scientific benefit and precision, while minimizing discomfort. Surgery is performed on healthy adult animals. Inhalant anesthesia is provided, and body temperature and respiration are continuously monitored during the surgery. Animals will receive both pre- and post-operative analgesia and prophylactic antibiotics to minimize pain and risk of infections. Animals are checked frequently after surgery for signs of distress or sickness (e.g., eating and grooming habits, fur quality, etc.).

Because of viral injections, surgeries take place in a class-II biosafety cabinet in a DM-II facility. Depending on the target, we will use either replication-defective Adeno Associated viruses (AAV)/CAV2/G-deleted, pseudotyped Rabies viruses or concentrated replication-incompetent, self-inactivating lentivirus. Different viruses are used to target different subclasses of cells, but none of the viruses are associated with any discomfort, brain damage, behavioral impairments, or bodily harm. Instead, the virus causes the production of opsins in neurons that allow us to provide microstimulation to briefly excite or inhibit those neurons.

State-of-the-art electrodes will be implanted to record the activities of several dozens of neurons and neural circuits simultaneously. Improved electrode technology allows for smaller and thinner probes (meaning less damage to the brain as the electrode is implanted). Depending on the experiment protocol, electrodes will be implanted into the cortex, thalamus, striatum, ventral tegmental area, or locus coeruleus. Surgical implantation is done via digitally controlled manipulator arms that provide very high targeting precision, based on standardized rat brain atlases. In most cases, the virus and electrodes are implanted in the same session, minimizing the time spent under anesthesia. For animals in the reward learning tasks, small cannulae will be implanted to deliver dopamine receptor antagonists or to measure extracellular dopamine concentration via fast-scan cyclic voltametry. This is part of the continuous monitoring, and does not cause any additional discomfort.

After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows chronic recordings for up to 18 months (or less if humane endpoints are reached), maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized. Electrodes and optical fiber are secured to a headpost, which is like a cap that is secured to the skull via screws and bone cement. The headpost is 3D-printed to be strong yet light. Animals quickly adjust to the presence of the headpost and are not impeded by it during daily activities. We have gained considerable expertise

at designing and implanting these devices, and are confident that it causes minimal discomfort while maximizing scientific benefit. We use special-designed cages that are taller to prevent the headpost from accidentally hitting the top part of the cage.

Recovery time from surgery is typically 3-5 days.

## **Phase 2: Tasks and recordings**

Adult rats will be tested in awake head-fixation during behavior tasks (the effort-conflict experiment will involve freely moving animals). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for 60-90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, IR cameras and breathing monitors allow behavior and physiology to be monitored for signs of distress.

**Below is a list of the tasks we will use.** All tasks are similar in their duration and amount of discomfort; the different tasks are designed to test different aspects of executive functioning. Each experiment will include **12 animals per group**. A statistical justification for this number is provided in the next section. Some behavioral training will begin prior to surgery to familiarize the rat to the experimental setup and stimuli. Head fixation is gradually introduced through handling and rewards, following standard procedures used at the Radboud and many other universities.

*Reward learning task (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in four groups: 5HTT knockout model, WT sham controls, Th:Cre optogenetics, sham optogenetics). The purpose of these tasks is to investigate the local and long-range neural circuitry underlying reward learning-related interactions between the executive functioning network and sensory processing regions. Rats will undergo operant reward conditioning. Stimuli of different modalities (visual, auditory, whisker) will be paired with liquid rewards, while other stimuli will not be paired with rewards (punishments and aversive stimuli will not be used). Licking spouts will be available to indicate behavioral responses. Dopamine interventions using optogenetics and receptor antagonists are applied to the Th:Cre and sham groups. Optogenetics will be used to modulate the dopamine system to determine its role in learning and inter-regional synchronization, and receptor antagonists are applied during learning to determine receptor specificity of the synchronization effects. Electrodes will be implanted in the cortex (prefrontal and relevant sensory area), striatum, VTA, and thalamus (max. 4 targets per animal).*

Number of animals: 144 (12 animals per group, 3x4 groups for sensory modalities and animal type)

*Sensory detection/discrimination tasks (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in four groups: 5HTT knockout model, WT sham controls, Th:Cre optogenetics, sham optogenetics) The purpose of these tasks is to investigate how sensory processing is modulated by top-down control of the executive functioning network, how this top-down control is modulated by dopamine (assessed via optogenetics and receptor agonists), and how it might be compromised in hyper-vigilant models (the 5HTT animals). Rats will be trained to report the detection of a brief and weak sensory stimulus, or between two similar stimuli, i.e., low (~15 Hz) and high frequency (~90 Hz) whisker vibrations. Sensory stimulation may be visual, auditory, or pulsatile whisker vibration, following established protocols (e.g., Mayrhofer et al. 2013; Friedman et al., 2015) that we have determined to be successful in our previous studies. Behavioral responses are reported by tongue lick, and liquid rewards are given for performance. Electrodes will be implanted in the cortex (prefrontal, parietal and relevant sensory area), VTA, and thalamus (max. 4 targets per animal).*

Number of animals: 144 (12 animals per group, 3x4 groups for sensory modalities and animal type)

Response conflict task (one group for optogenetics and one for sham): The purpose of this task is to examine neural and systems-level activity in an executive functioning task that is established in humans (Cohen, 2014) and in rats (Courtière et al., 2007), although it has not been done using electrophysiology or optogenetics. Rats learn that licking a left-side post is rewarded for picture "A" on a computer screen, and that licking a right-side post is rewarded for picture "B". Pictures are displayed on the left or on the right side of the animal. Response conflict is induced when picture "A" appears on the left side of the animal but it must make a rightward movement (the conflict is between reward-associated approach behaviors and the goal-relevant behavior). Additional control conditions will include sensory stimuli not associated with any particular behavioral responses or rewards (to rule out potential explanations of task-irrelevant sensory processing). Electrodes will be implanted in the cortex (medial prefrontal and relevant sensory area), striatum, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 24 Th:Cre

Effort-conflict task (one group for optogenetics and one group for sham): The purpose of this freely-moving experiment is to determine the contribution of the medial prefrontal cortex and striatum to effort-based decision-making. The task is modeled after published designs shown to be successful in rats (Friedman et al., 2015; Walton et al., 2002). Our novel and important contribution will be the large-scale electrophysiology and optogenetics to determine how synchronization in the executive functioning network contributes to the decision of whether to exert additional effort for a larger reward. Rats will run down a T-maze and will be able to choose whether to climb a small barrier for a small reward, or a larger barrier for a larger reward. This is an established experiment and requires an intact medial prefrontal cortex (Walton et al., 2002). Electrodes will be implanted in the cortex (medial prefrontal and relevant sensory area), striatum, and thalamus (max. 4 targets per animal).

Number of animals: 24

*Resting "task" (all animals):* Rats will not be required to perform any specific behaviors, but instead will simply remain calm. We will use similar stimulation protocols as described above. These recordings provide an important comparison condition for the task-related dynamics.

### **Electrical and optogenetic stimulation**

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the medial prefrontal cortex. We therefore expect that silencing the thalamus during executive functioning tasks will cause a reduction or elimination of medial prefrontal theta. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to test these hypotheses using alternative methods.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic. Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity and is therefore more physiologically realistic. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature.

### **Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation**

To achieve interpretable results, it is important that all animals remain healthy and do not show signs of stress or reduced well being during all experimental procedures. Indeed, only healthy animals can provide the best quality data. Animals will be checked daily for any signs of sickness. Humane endpoints of the research are reached by overt signs of sickness, loss of body weight (more than 15%) or other indications of reduced well being.

If discomfort levels appear to be unusually high (immobility, refraining from drinking or eating, pale color of eyes and skin), the animal will be euthanized and a post-mortem examination will be performed with the aim of understanding possible causes and potentially further refining our procedures.

Euthanasia will be performed with an injection of pentobarbital. After carefully checking the level of anesthesia (absence of tail-pinch reflex), perfusion with paraformaldehyde will be completed in order to remove and section the brain for histological verification of electrodes and fiber placements, and viral expression.

### **Pilots**

It is important to optimize our surgical and experimental techniques. This will improve the scientific quality of the data as well as minimizing discomfort for the animals. We therefore request an additional 30 (WT) rats for piloting (10-15 for behavioral task piloting, and 15-20 for surgery piloting). These will be used to test surgical procedures and ensure that the tasks are sufficiently well-designed.

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

---

### **STATISTICS FOR NEURAL DATA**

For the neural data, we focus on time-frequency-based analyses of oscillations, synchronization, and spike-field coherence. The primary PI involved in this research is an expert in these kinds of data analyses, as exemplified by his 600-page textbook on neuroscience data analyses and statistics [REDACTED]. Each animal will provide many hundreds of trials of data, ensuring a large probability of high-statistical-power results.

Statistical analyses vary depending on the specific analysis, but mostly involve either (1) non-parametric permutation-based testing or (2) parametric test such as ANOVAs or multiple regressions. Multiple comparisons issues are addressed using: (1) cluster- or maximum-pixel correction for time-frequency-space analyses; (2) Bonferroni correction across groups; (3) split-half replication, in which all analyses are performed on 50% of the data, and the findings are confirmed in the other 50% of the data.

### **STATISTICS FOR BEHAVIORAL DATA**



Behavioral data analyses will generally utilize t-tests or ANOVAs, as appropriate per experiment. In some cases we will also perform cross-trial correlations between brain and behavior within-animal, using either Spearman correlations or general linear models. Corrections for multiple comparisons are applied as appropriate, as are corrections for sphericity violations in the case of unbalanced multifactor ANOVAs.

### **CALCULATION OF THE NUMBER OF ANIMALS PER GROUP**

Having a sufficient sample size is crucial in neuroscience experiments (Button et al., 2013; Nieuwenhuis et al., 2011). In total, we will utilize 12 animals per group. This number is derived from power analyses of previous literature. For example, the effect sizes from one study using similar analyses (van Wingerden et al., 2014) suggests that 11 animals is sufficient for a power of  $\beta=.8$  and  $\alpha=.05$ . Having 12 animals also provides some buffer in case we need to exclude data if a few animals are not able to complete the tasks, if there are technical problems, or if humane endpoints are reached. Post-hoc power analyses will be conducted on our findings and reported in our publications.

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, Munafò MR. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14(5):365-76.

Nieuwenhuis S, Forstmann BU, Wagenmakers EJ. (2011). Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nat Neurosci.* 2011 Aug 26;14(9):1105-7.

van Wingerden M, van der Meij R, Kalenscher T, Maris E, Pennartz CM. (2014). Phase-amplitude coupling in rat orbitofrontal cortex discriminates between correct and incorrect decisions during associative learning. *J Neurosci.* 2014 Jan 8;34(2):493-505.

---

## **B. The animals**

---

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

---

**We will use three types of animals. In the previous sections we outlined the justification of animal numbers for each experiment.** We will use males for the dopamine studies, because estrus-cycle effects on the dopamine system may affect our results. For other studies we will use males and/or females.

*Sprague Dawley.* These animals are known for being calm and easy to handle. They are also one of the most commonly used breed in neuroscience, which facilitates comparisons across experiments.

*Th:Cre.* These animals express cre-recombinase in cells that contain tyrosine hydroxylase, which is an enzyme involved in the production of dopamine. It is therefore a marker of dopamine cells and allows us to target dopamine cells in optogenetic studies (Witten et al., 2011). Their background is Sprague-Dawley, which makes them comparable to the non-Th:Cre rats. This strain is not associated with any behavioral, cognitive, or physical impairments, or any other genetic disorders.

*5-HTT Knockout.* These animals show an increased sensitivity to environmental stimuli for behavioral guidance. This is expressed as an increased cognitive performance in tasks assessing the ability to change behavior in response to changes in the predictive values of (conditional) environmental stimuli, and changes in response rule (Nonkes et al. 2012, 2013, 2014). They are an important model for executive functioning.

*Wistar wild-type (WT)*. These are the same background as the 5-HTT knockouts and serve as WT controls.

The table below illustrates the number and types of animals for each experiment.

Strain	Task					Grand total
	<u>Rew. Learn</u>	<u>Sensory</u>	<u>Conflict</u>	<u>Effort</u>	<u>Pilot</u>	
<u>5HTT KO (Wistar)</u>	36	36	0	0		
<u>Wistar WT</u>	36	36	0	0		
<u>ThCre (Sprague Dawley)</u>	36	36	12	12		
<u>Sprague Dawley WT</u>	36	36	12	12	30	
Totals	144	144	24	24	30	<b>366</b>

Nonkes LJ, van de Vondervoort II, Homberg JR. (2014). The attribution of incentive salience to an appetitive conditioned cue is not affected by knockout of the serotonin transporter in rats. *259:268-73*.

Nonkes LJ, Homberg JR. (2013). Perseverative instrumental and Pavlovian responding to conditioned stimuli in serotonin transporter knockout rats. *Neurobiol Learn Mem. 100:48-55*.

Nonkes LJ, ... Homberg JR. (2012). Serotonin transporter knockout rats show improved strategy set-shifting and reduced latent inhibition. *Learn Mem. 19(5):190-3*.

Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev. 2014 Mar;40:1-5*.

Witten IB, ... Deisseroth K (2011). Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron, 72(5):721-33*.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Own breeding colony: Sprague Dawley WT	126	Adult
Rat	Own breeding colony: Sprague Dawley Th:Cre	96	Adult
Rat	Own breeding colony: Wistar WT	72	Adult

Rat	Own breeding colony: Wistar 5HTT KO	72	Adult
-----	--	----	-------

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement.

There are several large-scale efforts to develop accurate computational models of the brain or brain subsystems. Though promising, these models still require confirmation from empirical studies. In our own research, we are working on a computational model of medial frontal cortex functioning that will be informed by this research. However, at present, the kinds of experiments discussed in this proposal are necessary to develop a better understanding of brain function. Thus, it is currently not possible to replace animal models with computer simulations. Furthermore, lower animal species such as insects do have sufficient cognitive capabilities to make them valid models for understanding cognitive function in humans.

The primary measurement technique used here -- invasive electrophysiology -- is generally not available in humans. There are some clinical situations in which subdural electrodes are placed (e.g., epilepsy or deep-brain-stimulation), but these recordings are generally made from unhealthy tissue, these patients are infrequent and difficult to access, and the recordings often do not include spikes. Thus, rodents are necessary and at present cannot be replaced by another species.

#### Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of rats needed to answer the research questions, while having a sufficient number of animals for high statistical power. As mentioned earlier, there are two important components of our research that work towards reduction of the number of animals that will be tested. First, we obtain high-density multisite chronic recordings from each animal. This sharply reduces the number of animals we need to test to obtain sufficient data. Second, we will make all of our collected data publicly available for other scientists to download and use. This reduces the number of animals tested by other research groups around the world, because several hypotheses can be tested in our data, rather than having to collect new data.

**Refinement.**

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. We believe that only healthy animals with minimal stress can provide the high-quality scientific data that we seek. Therefore, we are highly motivated to refine our procedures as best as possible.

The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. Furthermore, we are continuously monitoring and discussing our procedures to minimize discomfort and improve the health and well-being of the animals. For example, stringent aseptics will be used during surgery to minimize discomfort and facilitate recovery. There are several groups at our institute who use similar surgical and experimental procedures, and we discuss in group meetings issues related to improvement of animal welfare.

---

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

Our procedures are guided by strong considerations for the welfare of the rats. Unhealthy or stressed animals provide bad data, and it is thus obvious from both scientific and welfare perspectives that the animals must be kept as healthy and comfortable as possible. Furthermore, we continuously seek to improve our procedures, and this topic is often discussed in group meetings. Section H3 details sources of discomfort and how we will seek to minimize or mitigate them.

## Repetition and Duplication

---

### E. Repetition

---

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

Non applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

Following is a list of components of the research that may cause discomfort, and how we will minimize discomfort.

*Initial arrival.* After arrival or transfer from the breeding facility, animals will be allowed to adapt to the animal facility for at least 7 days. They will be singly housed, and will be in sight and sound contact with other rats. They will be regularly weighed and checked for general health. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures. Cage enrichment is available.

*Surgical implantation of electrodes and viruses.* Animals will be weighed and anesthetized with 2-4% isoflurane (4-5% for induction) according to standard protocol. During surgery, animals will be placed on a heating pad and their heart rate and blood oxygenation levels will be monitored continuously. After thorough cleaning of the skin surface, lidocaine (2-4%) will be injected locally around the incision site. Surgery is performed while the animal is under isoflurane-maintained anesthesia. Analgesic treatment with buprenorphine during surgery is provided, because although animals are not conscious of the pain during surgery, it can still sensitize the central nervous system causing more pain post-operatively (analgesics will minimize post-op pain).

NaCl will be given subcutaneously to keep the rats hydrated. Rats receive sterile 0.9% NaCl injections subcutaneously: 5 ml per 100 g of body weight, distributed in several injection sites, max 5 ml per site. The total amount of fluid should not be more than 25 ml, even if the animal weighs more than 500 grams. Carprofen is administered before they wake up at 5 mg/kg bodyweight. Animals will be kept under observation at 30C, and moved to its cage after approximately after 1 hour where they will have free access to food and water post-surgery. 24 hours after surgery animals are injected with analgesic carprofen. During one week after surgery their behavior, appearance and weight are monitored closely.

*Post-surgical procedures.* Animals will receive carprofen (4-5 mg/kg, s.c.) and buprenorphine (0.05-0.1 mg/kg in saline s.c.) after surgery as an analgesic. This will be repeated 24 hours later with both carprofen and buprenorphine and carprofen again 48 hours later. Three milliliters of saline (at body temperature) will be administered s.c. to prevent dehydration. A heating pad will be placed under the recovery cage to further facilitate post-anesthesia recovery, and will be closely monitored until fully recovered from anesthesia. Once awake, rodents will be placed in their home cage in an independently ventilated cage (IVC) located in a DM-II room for a 2-week quarantine period. After said period, animals may be considered virus free and returned to our conventional lab space. Animals will be weighed and checked for general health and recovery from surgery (wound recovery, mobility, etc.) daily for minimum of 3 consecutive days, but typically 5 days, until they regain their pre-operative weight. Animals that do not adequately recover from surgery and show reduced signs of well-being (loss of more than 15% of pre-operative body weight) will be euthanized in accordance with "humane end points." Several research groups at the institute have extensive experience with these general stereotaxic techniques and have developed a highly standardized protocol for both the surgical procedures as well as pre-, peri- and post-operative care. Animal welfare logbooks will be kept. Rodents will be allowed to fully recover before commencement of the experiment procedures.

*Housing.* Single housing is necessary for this research because of the headpost that is attached to the head. Other rats may bite or scratch at this construction, which would cause damage and could lead to infection or death. However, single housing can cause moderate discomfort for rats,

because they are social animals. All cages are kept in close proximity, meaning rats can see, hear, and smell each other. Animals are checked daily for signs of sickness or stress, and are frequently weighed (typically, daily).

*Food and water restriction.* Water or food restriction is necessary to keep animals motivated to learn and perform the tasks. In general, we prefer water restriction over food restriction for three reasons: It causes less discomfort, it is easier to regulate, and it has a faster time-course (animals get thirstier faster than they get hungry). In our experience, water (particularly with some added sucrose) is an excellent reward for training. Food restriction is used when water restriction is insufficient. However, excessive restriction is neither necessary nor desirable. Animals will be kept at approximately 90% body weight during training and during early phases of the recordings. If weight drops below 85%, ad libitum food and water are provided until they return to normal weight. Restriction becomes less necessary as the animals are familiarized and trained on the task.

*Behavioral tasks.* The tasks are not associated with any direct discomfort (no punishments, shocks, or other aversive stimuli are used). All tasks involve some reward component (typically, liquid reward delivered through spouts). Breaks are provided every 10-20 minutes to allow the rat to relax or run on a treadmill or disk. Recording sessions will last no longer than 90 minutes per day, or shorter if there are signs of stress or discomfort, for up to five days per week. Head-fixation causes discomfort, particularly in the beginning. Animals are introduced to head-fixation slowly and are given rewards like sucrose water, soy milk, and sweet yogurt. Within days to a few weeks, animals learn that the head-fixation is safe, is associated with rewards, and does not last very long.

*Stimulation.* Based on literature and our previous experience, focused brain stimulation techniques do not cause any noxious effects. The stimulation is titrated per animal to be as minimal as possible while producing a measurable effect.

---

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

---

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

---

See H3

Explain why these effects may emerge.

---

See H3

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

---

See H3

---

### **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.

Humane endpoints include overt signs of sickness or clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment). Other risks arise from errors or infections during surgery and implantations. Needless to say, each animal is important and we do our best to avoid unnecessary risks or infections. In our experience, humane endpoints resulting from experimenter or surgical errors in <5% of cases. In such events, discussions are held to determine the source of the mistake and strategies to improve our techniques.

Indicate the likely incidence.

Based on previous research and our experience, we anticipate <5%.

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

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

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort resulting from the surgery and recover from anesthesia, as well as moderate discomfort from single-housing (animals are in continuous smell/sound range of each other, which mitigates this source of discomfort to some extent). Even in the exceptional situation of an infection (<5%), pain management drugs and timely application of the humane endpoints will prevent extreme discomfort. From the group of 30 pilot animals, 10-15 animals will be used for task piloting and optimization. These animals will not undergo surgery or anesthesia, and may experience mild discomfort from food or water restriction.

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?



**L. Method of killing**

No

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

It is necessary to confirm the expression of the virus and placement of the electrodes in post-mortem imaging of the brain.

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

**Format****Niet-technische samenvatting**

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

## 1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
1.2	Looptijd van het project	18-4-2016 - 18-4-2021
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	executieve functies, cognitie, hersenactiviteit, fundamentele onderzoek

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>De executieve functies (EF), zoals werkgeheugen, gedrag aanpassingen, en besluitvormingsproces, zijn belangrijk voor het leven in de samenleving. Verstoringen van de EF zijn een belangrijk onderdeel van hersenziekten zoals Parkinson's en schizofrenie.</p> <p>Het meeste onderzoek naar de EF is in mensen gedaan. In mensen kan de gemiddelde activiteit van miljoenen hersencellen tegelijk gemeten worden. Uit onderzoek bleek dat zogenoemde "elektrische hersengolven" een teken zijn van EF. Maar wat precies zijn die hersengolven en wat doen ze voor de communicatie tussen hersengebieden die belangrijk voor EF zijn?</p> <p>De bedoeling van ons onderzoek is meer inzicht vergaren in de neurale mechanismen van de EF. Wij gebruiken daarvoor rat-modellen. Hierdoor kunnen wij elektroden in de hersenen plaatsen en de activiteit van individuele hersencellen, groepen van hersencellen, en populatie activiteit tegelijkertijd meten. Daardoor kunnen wij de processen van de EF nauwkeuriger in kaart brengen en begrijpen.</p>
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Er zijn vele fundamentele vragen over hoe informatie wordt verwerkt binnen het "EF netwerk" zoals: hoe wordt informatie gedeeld binnen deze regionen, hoe beïnvloedt het EF netwerk processen in sensorische gebieden, en wat is de rol van neurochemicaliën zoals dopamine hierin?</p> <p>Dit fundamentele onderzoek is van belang om in de toekomst beter te begrijpen wat er in de hersenen mis kan gaan, zoals bijvoorbeeld bij Parkinson's ziekte. Wij zullen ook alle onze data beschikbaar maken aan de wetenschappelijke gemeenschap.</p>
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Maximal 366 ratten over 5 jaar.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<p>Om goede metingen te kunnen verrichten worden er speciale elektroden in het brein geplaatst middels een operatie. Deze operaties en het bijkomen uit narcose zullen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en antibiotica worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken.</p> <p>Wij gebruiken lichte water- en voedselbeperkingen om de gedragsmotivatie van de ratten te verhogen. Zij krijgen sap en andere beloningen tijdens de experimenten.</p>
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Alle dieren ondergaan vergelijkbare handelingen die een matig ongerief als gevolg hebben.

3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Alle dieren worden na afloop van de proef gedood (door middel van anesthesie pijnloos) om hersenweefsel te onderzoeken.
-----	---	---

## 4 Drie V's

4.1	<b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Metingen in mensen zijn niet precies genoeg om zenuwcellen te meten. Daarom zijn dierproeven die hier beschreven worden nog noodzakelijk.
4.2	<b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Wij gebruiken speciale elektroden die heel veel gegevens kunnen verzamelen per dier. Wij maken onze meetgegevens openbaar beschikbaar aan de wetenschappelijke gemeenschap. Andere wetenschappers zullen daardoor minder zelf dierproeven hoeven te doen.
4.3	<b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	Alle handelingen zullen worden verricht door ervaren personeel. De experimenten en diermodellen die we gebruiken staan bekend om de betrouwbare resultaten. Wanneer mogelijk werken wij aan het verbeteren van onze experimenten en procedures. Het is onze overtuiging dat de beste resultaten behaald worden met gezonde dieren met een zo laag mogelijk stressniveau.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Alle handelingen zullen worden verricht door ervaren personeel. Alle dieren krijgen de tijd om te wennen aan de nieuwe leefomgeving en de onderzoeker. Ratten moeten alleen gehuisvest worden. Desondanks kunnen ze contact hebben met andere ratten. Rondom operaties zal adequate pijnstilling worden gegeven. Rondom operaties wordt nutriëntenrijk voedsel aangeboden om het herstel te bevorderen. In alle gedragsproeven worden ratten beloond (sap, yoghurt, enz.). De dieren krijgen nooit vervelende of pijn stimuli.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0129
2. Titel van het project: Neural synchronization and executive functions
3. Titel van de NTS: Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 11-01-2016 en 02-02-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 18-01-2016 tot 25-01-2016 en van 08-02-2016 tot 12-02-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 12-02-2016
  - advies aan CCD: 17-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 18-01-2016
  - Strekking van de vragen:
 

**Project Proposal:**

-3.1 Uit de bijlage blijkt dat de onderzoekers drie verschillende sensorische modaliteiten willen onderzoeken. De rationale hiervoor ontbreekt in de beschreven achtergrond.

-3.2 De onderzoekers willen hypothesen testen over hoe neurale oscillaties een rol spelen bij de verwerking van sensorische informatie door de prefrontale cortex in relatie met gebieden in thalamus en basale ganglia die samen het executieve netwerk vormen. De connectiviteit tussen de diverse delen van het netwerk lijkt daarbij van belang. Deze hypothesen zijn verder

niet uitgewerkt. Welke hypothesen bedoelen de onderzoekers precies, en kunnen zij in de beschrijving van de strategie aangeven hoe zij deze hypothesen zullen testen?

-3.4 Het hoofddoel van dit onderzoek is te evalueren of (en hopelijk aan te tonen dat) ratten een goed model zijn om de specifieke neurale mechanismen te bestuderen die ten grondslag liggen aan executief functioneren. Bij welke uitkomsten zijn ratten een goed model om het menselijke executieve functioneren te bestuderen? Verder zijn de onderzoekers op zoek naar een beter begrip hoe de neurale activiteit in hersengebieden voor cognitie en sensorische prikkelverwerking het executief netwerk bestuurt. Ook deze vraagstelling is niet nader uitgewerkt.

De commissie vraagt zich af of er een fasering mogelijk is. Kunnen de onderzoekers eerst aantonen dat de rat een goed model is om executief functioneren in te onderzoeken (bijvoorbeeld doordat er (een equivalent van) theta-golven bij ratten ontstaan door executief functioneren), alvorens zij de invloed van het executief netwerk op andere hersengebieden gaan onderzoeken? Overigens wil de commissie opmerken dat de theta-golven bij de rat een andere relatie tot gedrag hebben dan bij de mens.

-3.4.1 De strategie voor het behalen van de doelstelling ontbreekt ten enenmale. De onderzoekers geven alleen een beschrijving van de dierproeven die uitgevoerd zullen worden, zonder toe te lichten welke onderzoeksvragen zij met deze dierproeven denken te beantwoorden. Zo blijft het in de huidige aanvraag volstrekt onduidelijk hoe de dierproef zal leiden tot de onder 3.2 geformuleerde eerste doelstelling. Ook wordt niet ingegaan op de onderzoeksvraag waarvoor het nodig is om een specifiek hersengebied elektrofyysiologisch of optisch te stimuleren.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.1 The following text was added to section 3.1:

Does the executive functioning circuit work the same way for different sensory modalities (e.g., vision, audition, whisker stimulation)? It has been assumed to be the same generic process in humans (Botvinick et al., 2001), but this assumption has not been directly tested, in part due to difficulties in isolating different sensory processes using non-invasive measurements in humans. In humans, functional connectivity between the prefrontal cortex and the visual cortex has been demonstrated (Cohen, 2014), but whether similar patterns exist for other modalities is unknown. It is important to determine whether the mechanism by which the executive functioning circuit biases processing in sensory areas is the same for different sensory modalities.

And the following text was added to section 3.2:

The primary purposes of this research are ... determine whether the executive functioning circuit has sensory-modality-specific functions or is generic for different sensory modalities.

-3.2 The following text was added to section 3.1:

Furthermore, the roles of the thalamus and striatum are difficult to study in humans, because EEG cannot measure deep-brain activity with high precision, and fMRI cannot measure electrophysiological activity. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus gates sensory information into the medial prefrontal cortex in order for the prefrontal cortex

to detect competing sensory inputs. Only research in rats can provide evidence for these kinds of hypotheses.

And the following text was added to section 3.2:

The role of oscillations in information-transfer has been demonstrated, for example in primary visual cortex and in computational simulations of neural networks. We aim to establish that similar mechanisms hold between the executive functioning circuit and sensory regions. These mechanisms will be tested via spike-field coherence (do theta oscillations in the prefrontal cortex control the timing of neurons in sensory cortices?) and spectral coherence (is population activity in the prefrontal cortex synchronized with population activity in sensory cortex?). Furthermore, we believe that the thalamus and striatum act as "middlemen" to regulate the flow of information between the prefrontal cortex and sensory regions.

Finally, we clarified the outcome measures in the section Experiment approach and primary outcomes parameters in the description of animal procedures.

-3.4 It is known that rats can perform executive functioning tasks (at least fairly simple tasks) in a comparable way as humans (in terms of behavioral performances). Furthermore, theta oscillations have been reported in the rat prefrontal cortex during rest and tasks that do not involve executive functioning. But the critical link between theta and executive functioning is missing in the literature. We will use tasks that have been used in humans or that can easily be adapted for use in humans. Our analyses will focus on characteristics of the data that are similar between rats and in humans. That is the anchor point to investigate patterns of spiking and other factors that are not possible in humans.

Several additional statements have been added along these lines, in the background and in the primary outcome measures.

Thank you for the interesting suggestion about staging of the research. However, we feel this is not the best use of the animals, for ethical and for scientific reasons. Scientifically, if we don't find strong executive-functioning-related theta oscillations, the studies are still worth continuing; we would then shift the focus of the analysis to whatever is the most robust finding. Mainly, this will limit the ability to generalize the findings to humans. Furthermore, having multiple electrodes provides an enormous scientific benefit beyond having a single electrode.

From an ethical perspective, the main discomfort of this research comes from surgery; implanting more than one electrode provides little additional discomfort (the weight of the electrodes is negligible), except that the surgery takes a bit longer. Given the major increase in scientific benefit with minimal increase in discomfort, there seems to be no advantage of using animals only for single-electrode implantations (except during piloting).

This is now clarified in a new subsection in Experiment approach and primary outcomes parameters in the description of animal procedures.



The following text was added to 3.1:

#### IS ALL "THETA" THE SAME?

There is no unitary "theta function." In humans it has been demonstrated that theta oscillations in occipital cortex are different from theta oscillations in the medial prefrontal cortex, which are different from theta oscillations in the hippocampus (Cohen, 2014). Although most people associate "theta" in the rat with hippocampus and memory, other findings have shown that theta in the prefrontal cortex is independent of hippocampal theta (different frequency, different statistical characteristics, and so on) (Pignatelli et al., 2012). This is why the multielectrode recordings are critical, and why our research will be important for understanding the role of neural oscillations in brain function.

-3.4.1 I apologize for the confusion. I am unsure what changes to make here, because more detailed descriptions are provided in the animal procedures section. I was specifically instructed to keep section 3.4.1 as brief as possible, and to provide only a simple overview of the main components of the research as they relate to animal welfare and experimental procedures, not how the hypotheses will be tested in off-line data analyses. The revised version contains additional material indicating that the behavioral tasks provide the electrophysiological data we will analyze, and that more details are provided in the animal procedures section.

The following text was added to Animal Procedures:

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the MFC. We therefore expect that silencing the thalamus during executive functioning tasks will cause a reduction or elimination of MF theta. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to do it any other way.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic. Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity and is therefore more physiologically realistic. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 08-02-2016

- Strekking van de vragen:

#### **Project Proposal:**

- 3.1 De werking van het brein is nog onvoldoende toegelicht in de achtergrondbeschrijving van de aanvraag om de onderzoeksstrategie te kunnen navolgen. De rol van neurochemicaliën zoals dopamine (waarnaar wordt verwezen in de niet-technische

samenvatting) is bijvoorbeeld nog onderbelicht (zie ook de vraag over onderdeel B van de DAP).

**Description of Animal Procedures:**

-B: De kolom Origin in de tabel is niet goed ingevuld: betreft het dieren uit eigen fok of worden zij van een bedrijf gekocht?

-B:De rationale voor het gebruik van de 5-HTT knockout en Th:Cre ratten is onvoldoende toegelicht. Hierover is niets vermeld in de achtergrondbeschrijving van het projectvoorstel.

-H3: De commissie is van mening dat het ongerief van solitaire huisvesting gedurende 18 maanden matig is in plaats van 'minor'. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

- Datum antwoord: 12-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.1 It is clear to me now that the previous version was too technical and lacking the "big picture" goals. I tried to streamline section 3.1, which resulted in adding new text, deleting redundant or confusing text, and moving other text around. Because of the myriad changes, I decided not to highlight this section in red font, because the entire section would be highlighted and this is annoying to read. I also changed some text in sections 3.2 (in red font). I hope this section is now more comprehensible and comprehensive.

**Description of Animal Procedures:**

-B: I apologize for the confusion, as I was previously given different advice. All animals are taken from local breeding facilities. This information is included in the "Origin" column of the animal table.

-B:Thank you for pointing out that this was not sufficiently clarified. I hope the revised section 3.1 now clearly describes our motivation for using these groups.

-H3: The level of discomfort was changed from minor to moderate in sections H3 and K1.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

### C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'a better understanding of how the executive functioning network is able to modulate neural activity in brain regions responsible for sensory processing and cognition'. De hoofddoelstelling is uitgewerkt in vijf subdoelen die met elkaar bijdragen aan meer inzicht in de werking van het executief netwerk'. De onderzoekers focussen daarbij op theta oscillaties omdat die optreden bij executief functioneren bij mensen, en hun relatie tot de actiepotentialen van individuele neuronen in de hersenen van ratten die gedragstesten voor executief functioneren uitvoeren. Ook zal worden gezocht naar andere patronen in de hersengolven die samenhangen met executief functioneren van de ratten. De te behalen resultaten zullen meer inzicht verschaffen in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van ratten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat verstoring van het executief functioneren bij verschillende ziektebeelden optreedt. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de interactie van de verschillende hersengebieden betrokken bij executief functioneren kan leiden tot de ontwikkeling van effectievere medicatie of andere interventies. De DEC acht het vergaren van kennis omtrent de signaaltransductie tussen hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring met het analyseren van elektrofysiologische data. De gekozen aanpak leidt tot meer inzicht in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden die behoren bij het executief netwerk, en de rol van de neurotransmitters dopamine en serotonine daarin.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de operatie waarmee elektrodes, optische fibers, virus en/of canules worden aangebracht in de hersenen. Het ongerief als gevolg van de gedragsexperimenten, van de water- of voedselrestrictie, en van het doden onder anesthesie door perfusie met paraformaldehyde schat de DEC in als licht. De commissie schat het ongerief als gevolg van de hersenoperatie onder anesthesie met adequate pijnbestrijding, en als gevolg van de langdurige solitaire huisvesting in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 95% van de ratten, en licht voor de overige ratten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De signaaltransductie in hersengebieden is dermate complex dat zij nog niet bestudeerd kan worden met computersimulaties. Dit onderzoek draagt wel bij aan het maken van dergelijke computermodellen, die het gebruik van proefdieren zouden kunnen verminderen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met de beschreven proefopzet en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Per dier worden veel data van verschillende hersengebieden verkregen op verschillende tijdstippen, waardoor er in totaal minder dieren nodig zijn. De verkregen data zullen beschikbaar zijn voor andere onderzoekers. In een pilot met 30 dieren zullen de onderzoekers ervaring opdoen met de operatietechniek en de gedragsexperimenten, waardoor variatie in de data door onervarenheid of het gebruik van minder goed ontworpen gedragsexperimenten wordt voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 366 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Door het aanbrengen van de headpost kunnen de dieren niet met soortgenoten gehuisvest worden. De dieren kunnen elkaar wel zien en ruiken, waardoor zij niet geheel afgezonderd zijn. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de signaaltransductie tussen de verschillende hersengebieden betrokken bij het executief functioneren van ratten, en de rol van dopamine en serotonine daarin. Het belang van meer inzicht in het functioneren van het executief netwerk acht de DEC substantieel, omdat het executief functioneren van patiënten met verschillende neurologische of psychologische ziektebeelden is verstoord. Op termijn kan dit onderzoek bijdragen aan effectievere medicatie of andere interventies voor deze aandoeningen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 5% van de dieren licht ongerief en 95% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de hersenoperatie en de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB [REDACTED] 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  
AVD103002016482

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016482. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10  
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB [REDACTED] NIJMEGEN  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 18 april 2016  
Geplande einddatum: 18 april 2021  
Titel project: Neural synchronization and executive functions  
Titel niet-technische samenvatting: Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

18 maart 2016

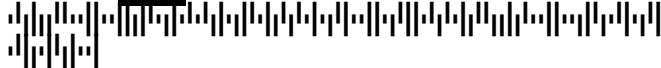


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB [REDACTED] 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  
AVD103002016482

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700482

Ordernummer: 040823-461220/ 2015-0129/ [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016482	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

9.

> 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  
AVD103002016482  
**Bijlagen**

1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft het gebruik van alleen mannelijke dieren in de dopamine experimenten verder uitgelegd. Op 15 april 2016 heeft u een nieuwe versie van uw NTS naar ons toe gestuurd, waarin het ongerief classificatie aangepast is.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. In de aanvraag zijn er geen duidelijk beslismomenten en de criteria daarvoor opgenomen. De voorwaarde over de go/no-go momenten is gesteld om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt in het geval dat in een eerdere fase van het onderzoek blijkt dat de verwachte resultaten niet worden gehaald.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, sublid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel.

U kunt met uw project "Neural synchronization and executive functions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 18 april 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met de aanvullingen zoals hierboven gemotiveerd.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv 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

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 18 april 2021, voor het project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 18 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 15 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Description of procedures for surgery and tasks.	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Sprague Dawley; Wistar; 5HTT KO; ThCre	366	95,00% Matig 5,00% Licht	

### Voorwaarden

#### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Specifieke voorwaarde:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat na de pilotexperimenten met de IvD wordt afgestemd wel dan niet het project verder uit te voeren, en dat de eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Algemene voorwaarde:

In artikel 10, sublid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

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

Uit artikel 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.



06 JUN 2016



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
- Change of rat strain from TH-CRE/WT Sprague Dawley to TH-CRE/WT Long Evans. In the CCD application we have made a mistake by writing down the wrong background of the animal strain. We would like to change this to the correct strain background, namely Long Evens instead of Sprague Dawley.

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 26 . 04 . 2016
- Einddatum 18 . 04 . 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neural synchronization and executive functions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hersenactiviteit, neuronale communicatie en cognitieve functies
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

<input type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input type="checkbox"/>

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Nijmegen
Datum	02 - 06 - 2016
Handtekening	[Redacted]





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

[REDACTED]  
Postbus 9101,  
6500 HB [REDACTED] NIJMEGEN  
[POSTNET]

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002016482-1

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 2 juni 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Melding projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben op 2 juni 2016 een melding ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Neural synchronization and executive functions" met aanvraagnummer AVD103002016482, waarvoor op 26 april 2016 een vergunning is afgegeven. Uw melding is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD103002016482-1.

U geeft aan een andere dan in de aanvraag vermelde rattenlijn te willen gebruiken: TH-CRE/WT Long Evans in plaats van TH-CRE/WT Sprague Dawley. De beschreven aanpassing aan het project leidt niet tot een toename van het aantal dieren en/of de mate van ongerief zoals beschreven in de oorspronkelijke aanvraag.

Deze melding volstaat. U mag de in de melding beschreven aanpassingen doorvoeren en verder gaan met de uitvoer van het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.







# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

## 1 Gegevens aanvrager

<p>1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 7 5 9 2 4</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht															
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]															
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4															
<p>1.3 Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i></p>	<table border="1"> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr> </table>	Straat en huisnummer	[Redacted]	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	[Redacted]															
Postbus	12007															
Postcode en plaats	3501AA Utrecht															
IBAN	NL27INGB0000425267															
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht															
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.														
Functie	[Redacted]															
Afdeling	[Redacted]															
Telefoonnummer	[Redacted]															
E-mailadres	[Redacted]															
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.														
Functie																
Afdeling																
Telefoonnummer																
E-mailadres																



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 4 . 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 0 1 . 0 4 . 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De korhoen komt terug naar de Hoge Veluwe
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

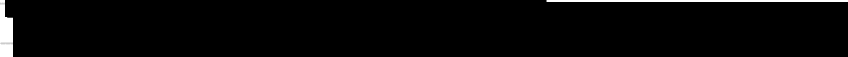
## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

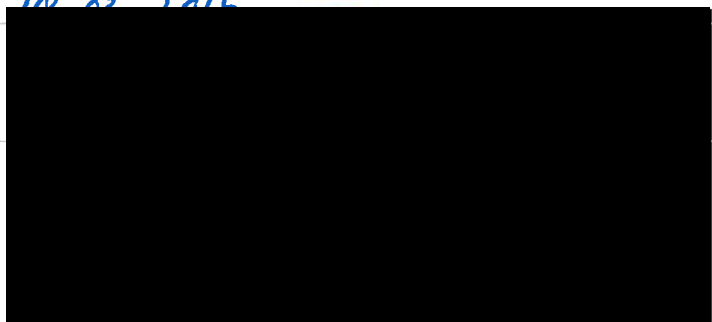
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende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

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 18-02-2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Korhoenpopulaties (*Tetrao tetrix*) zijn de laatste decennia in Europa sterk achteruitgegaan of zelfs verdwenen, zo ook in Nederland. Hier zijn verschillende oorzaken voor, zoals veranderingen in het leefgebied, verhoogde predatiedruk en verstoring door menselijke activiteiten. In Het Nationale Park De Hoge Veluwe (NPDHV) is, voor de herintroductie, in 1978 de laatste waarneming van een korhaan gedaan.

Het beheer van Het NPDHV is gericht op het in stand houden van het Veluwe landschap van begin twintigste eeuw. Het nog steeds voorkomen van soorten als grote wrattenbijter, zadelsprinkhaan, heivlinder, tapuit, heikikker, gladde slang is mede het gevolg van het beheer. Er zijn echter ook soorten verdwenen, een daarvan is het korhoen.

Sinds 2007 werkt De Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe aan het herintroduceren van deze, voor heidellandschappen kenmerkende vogel. (Leidekker 2014).

Voor het begin van de herintroductie is een haalbaarheidsstudie gedaan (Smit, 2003) en een plan van aanpak opgesteld. Hieruit bleek dat De Hoge Veluwe een geschikt biotoop vormt voor het korhoen. De versnippering van het potentiële leefgebied is in Het NPDHV veel minder een probleem dan in andere leefgebieden van het korhoen.

In 2007 is door de Raad van State uitspraak gedaan waarbij de rechtmatigheid van het project is erkend (LJN: AZ9015, Raad van State, 200604241/1). De herintroductie is mede getoetst aan de richtlijnen van de IUCN (1998) voor het herintroduceren van soorten (Smit & Bos, 2008).

Uit studies van eerdere herintroductie programma's in Europa komt naar voren dat vooral het aantal vogels dat jaarlijks wordt uitgezet en de duur van het uitzetprogramma van invloed zijn op het succes van de herintroductie. Verder blijkt dat een uitzet van minimaal 30 vogels per jaar voor een periode van minimaal 6 jaar noodzakelijk is om een kans van 50% op overleving en vestiging via reproductie te krijgen van de uitgezette vogels (Smit, 2003).

Sinds 2007 worden dus elk jaar in gevangenschap uitgebroede korhoenders in Het NPDHV losgelaten. Om het de uitgezette vogels makkelijker te maken worden beheermaatregelen uitgevoerd om het biotoop te optimaliseren (Leidekker 2014). Na de uitzetting in het najaar van 2008 waren naar schatting 2-5% van de uitgezette Korhoenders in het voorjaar van 2009 nog in leven (Smit & Koopmans, 2009). Ook na de uitzetting in het najaar van 2009 concludeerden Bos et al. (2010) dat de aanwezige vogels het levende bewijs zijn dat er in Het NPDHV en in de directe omgeving van Het Park leefgebied aanwezig is om de winter te kunnen overleven (Leidekker 2014).

Het project duurt in eerste instantie 10 jaar, heeft een fokgroep en een begeleidingscommissie. Daarnaast wordt er geadviseerd door Dave Baines, een internationale korhoenexpert van de Game & Wildlife Conservation Trust. Ook wordt eens in de 3 jaar kennis gedeeld via het International Grouse Symposium.

De herintroductie methoden zijn gedurende het project, op basis van veldwaarnemingen, geoptimaliseerd. Zo worden nu naast de hard-release methodiek ook "soft release" kooien gebruikt, waarin vogels al aan de omgeving, waar ze vrijgelaten worden, kunnen wennen (Leidekker 2014). Deze praktijk blijkt de overlevingskans van vrijgelaten vogels te verhogen (G@llinformed).

In meerdere Europese landen wordt er probeerd, de korhoen populaties te herstellen. In Nederland zijn in 2009 en 2010 korhoenders afkomstig uit fokprogramma's uitgezet op de Regte Heide, maar de meesten korhoenders zijn dood terugvonden. Dit kan daarop wijzen, dat of de predatiedruk te hoog was, of dat de vogels niet voldoende antipredator gedrag geleerd hadden. Het project is in 2011 gestopt zonder nadere maatregelen toe te passen.

In andere landen waren herintroducties succesvoller: In de Poolse Nationaalpark Poleski Park Narodowy (<http://www2.poleski.pn.pl>) worden sinds 2001 korhoenders vanuit andere gebieden herintroduceerd, met blijkbaar positieve resultaten (Dziedzic et al. 2007 in Krzywinski et al. 2009). Ook in Groot Brittannië is het verdwijnen van de korhoenders

een herkend probleem. De Britse "Game & Wildlife Conservation Trust" heeft 1999 de korhoen in het "Biodiversity Action Plan" opgenomen met het doel, de korhoenpopulatie te stabiliseren en uiteindelijk te vergroten. Door aangepast natuurbeheer groeiden de aantallen van 773 hanen in 1998 tot 1,200 hanen in 2007, en zelfs de verplaatsing van hanen naar nieuwe locatie was succesvol en leidde tot een verhoogde aantal broedende vogels.

Deze twee succesvolle voorbeelden laten zien, dat met het juiste beheer en maatregelen er wel een kans bestaat om het korhoen ook in Het NPDHV terug te brengen.

Een voorwaarde om herintroductie van diersoorten te rechtvaardigen is de oorzaak van de teruggang te herkennen (IUCN/SSC 2013). Verder is het cruciaal voor het beheer om de beweging van de dieren te begrijpen (Game & Wildlife Conservation Trust) en zo de beheerstrategieën en het succes van herintroductie te bepalen (Grant et al. 2009). Omdat maar een klein aantal van de in Het NPDHV vrijgelaten korhoenders terug gezien werd en om beheermaatregelen beter te kunnen toepassen, begon de Stichting NPDHV vogels met radiozenders uit te rusten om hun met antennes te kunnen volgen. Alle gezenderde dieren zijn dood gevonden, maar wetende dat er niet gezenderde dieren levend zijn gezien, is in 2012 voorlopig met zenderen gestopt (Leidekker 2014). Radiometrie is echter arbeidsintensief, wat het moeilijk maakt om meerdere dieren tegelijk te volgen. Verder kunnen de dieren verstoord worden door de achtervolging omdat men, om de positie van het dier te bepalen, het veld in moet met radioantennes. Zonder zenders wordt maar een enkele vogel dood teruggevonden en zijn er dus minder mogelijkheden om oorzaken van overlijden te herkennen en mogelijkere wijs te bestrijden. Verder is niet bekend of de niet gezenderde vogels het gebied verlaten.

In 2013 evalueerde David Baines het herintroductie programma van de Stichting Het NPDHV. Hij concludeerde, dat er een methode moest komen op basis waarvan individuele dieren kunnen worden gevolgd, mogelijk door gebruikmaking van GPS-techniek (Global Positioning System) (Baines 2013).

In dit voorgestelde project zal nu het gebruik van GPS zenders bij korhoenders in Het NPDHV getest worden. GPS zenders worden al lang in ecologisch onderzoek gebruikt, vooral bij trekkende vogels (Limosa Bird Tracking). De zender wordt aan het dier bevestigd en stuurt vervolgens data over de positie van de vogel naar een database. Vooral in laatste jaren is de ontwikkeling sterk vooruit gegaan, zo worden de zenders steeds lichter en hebben een langere batterijduur. Dit systeem zou dus uitermate geschikt zijn om de korhoenders in Het NPDHV te volgen en inzicht te krijgen wat er met de vogels gebeurt. Met deze informatie kan het toekomstige beheer van landschap en de korhoenders gericht toegepast worden.

Er bestaan verschillende opties om de zender of op de rug veren vast te plakken of als een soort rugzak op de vogel te plaatsen (Limosa Bird Tracking; Fijn et al 2012; Thaxter et al. 2014). Wij zijn in contact met meerdere gespecialiseerde bedrijven (Ecotone, madebytheo, pathtrack, Telemetry Solutions), om in overleg het meest geschikte systeem uit te zoeken. De keuzes hangen af van gewicht en grootte van de vogel, de manier van leven (lopende, zwemmend, vliegende vogels), en de omgeving (zon straling voor zonnepaneeltjes of batterij). Daarom hebben wij gekozen om een pilot studie op te zetten (Cuthill 1991) om, na keuze van een zender model, te testen of de zender ook daadwerkelijk geen negatieve invloed op de korhoenders zouden hebben. Na goedkeuring van deze aanvraag zal een de keuze en bestelling van de zender plaatsvinden.

De keuze van de juiste zender is belangrijk, omdat uit de literatuur blijkt, dat sommige zenders de overleving en broedgedrag van vogels kunnen verstoren (Constantini & Moller 2013). Maar, de meeste studies in deze meta-analyse zijn gericht op kleine, trekkende vogels, waarbij het gewicht van de zenders snel tot meer energieverbruik kunnen leiden, wat bij een vogel van 10 gram een zware impact kan hebben (Constantini & Moller 2013). Inderdaad, lichaamsgewicht, foerageren in de lucht en de manier van bevestigen (poot of rugzak), bleek de meest invloed te hebben, waarbij een zender aan de poot een negatievere invloed had dan een rugzak (Constantini & Moller 2013). Wij verwachten minder effecten van zenders bij de korhoender. Ten eerste kunnen wij lichtere zenders kiezen (in verhouding met het lichaamsgewicht) en korhoenders trekken niet en bewegen zich meestal op de grond, wat minder energie vraagt. Verder biedt Het NPDHV voldoende voedsel en bescherming door het aangepaste heide beheer.

Voor de groei van korhoenpopulaties blijkt vooral de predatie druk van belang te zijn (Summers et al. 2004; van den Bremer 2012). Ook hier kan het gebruik van de GPS zender een verhelderend beeld geven over de situatie van predatie in Het NPDHV, omdat gedode vogels opgespoord kunnen worden om de oorzaak van overlijden en, indien mogelijk, ook de predator bepaald kan worden (van den Bremer 2012). De resultaten hiervan zijn van belang zijn voor het toekomstige beheer van het NPDHV en de korhoen introductie. Blijkt dat ook op het NPDHV predatie de meest voorkomende oorzaak van overlijden is, kan het fokprogramma aangepast worden (bv leren van antipredator gedrag) en het landschap/ beheer (bv betere schuilmogelijkheden voor korhoenders).

Dit project is van belang voor de toekomst van de herintroductie van het korhoen in Het NPDHV. Zonder nauwkeurige gegevens kan het de uitvoering niet verbeterd worden en wordt de korhoen de kans op een duurzame vestiging niet gegeven. De gegevens zijn ook nodig om te onderzoeken of de toegepaste maatregelen tot hoger overleving en broedsucces van de korhoenders leiden. Zou dit niet het geval zijn, moet overwogen worden, ook hier de herintroductie te stoppen. Om deze beslissing te nemen, moeten van ten minste drie jaar data verzameld worden, om zo voor natuurlijke variatie in overleving door bv. klimaatomstandigheden te corrigeren. Met de gegevens uit drie jaren zou het

beheer van het NPDHV aangepast kunnen worden en vervolgens resultaten in twee opvolgende jaren gemeten kunnen worden. De ervaring en gegevens uit dit project zijn dus uitermate geschikt om ook andere korhoen-herintroductie programma's te adviseren.

#### Referenties

Baines, D. 2013. The re-introduction of Black Grouse at Hoge Veluwe National Park.

van den Bremer, L., Sierdsema, H. & Wouters, P.. 2012. Herintroductie van het Korhoen op de Regte Heide in 2009 en 2010. Sovon-rapport 2012/23. Sovon Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.

Costantini, D., Pape Møller, A., 2013. A meta-analysis of the effects of geolocator application on birds. *Current Zoology* 59, 697–706.

Cuthill, I., 1991. Field experiments in animal behaviour: methods and ethics. *Animal Behaviour* 42, 1007–1014.

Dziedzic R., Piasecki D., Wójcik M. & Misztal J. 2007: Wyniki wsiedlania cietrzewi w Poleskim Parku Narodowym [The results of black grouse introduction in the Poleski National Park]. I Międzynarodowa konferencja Ochrona kuraków leśnych [1st International conference Protection of forest grouses]. Book of Abstracts, Janów Lubelski: 21. (in Polish) in Krzywinski et al. 2009.

G@llinformed, Newsletter of the IUCN-SSC/WPA Galliformes Specialist Group, Issue 4 January 2011.

Game & Wildlife Conservation Trust, 2011. Conserving the black grouse: A practical guide produced by the Game & Wildlife Conservation Trust.

Grant, M., Cowie, N., Donald, C., Dugan, D., Johnstone, I., Lindley, P., Moncreiff, R., Pearce-Higgins, J., Thorpe, R., Tomes, D., 2009. Black grouse response to dedicated conservation management. *Folia Zool* 58, 195–206.

IUCN/SSC (2013). Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission, viiii + 57 pp.

Krzywinski, A., Keller, M., Krzywinska, K., 2009. New methods for preservation of genetic diversity of black grouse, *Tetrao tetrix*: preliminary results. *Folia Zool* 58, 150–158.

Leidekker, J.R.K., 2014. Het uitzetten van korhoenders. Een proces van de lange adem? *De Levende Natuur* 115(6), 273-276.

Limosa: Nederlandse Ornithologische Unie en SOVON Vogelonderzoek Nederland, 2014. Bird tracking, *Limosa* Themanummer 87.2/3.

<http://www2.poleskipn.pl> (22.12.2015)

Smit, R., 2003. Korhoenders in het Nationaal Park De Hoge Veluwe? Een studie naar de mogelijkheden voor herintroductie van korhoenders in het Nationaal Park De Hoge Veluwe.

Smit, R. & Bos, D., 2008. Voortgangsrapportage 2007 herintroductie Korhoen in het Nationale Park de Hoge Veluwe. A&W-rapport 1084.

Smit, R. & Koopmans, M., 2009. Voortgangsrapportage 2008-09 herintroductie korhoen in het Nationale Park de Hoge Veluwe. A&W-rapport 1284.

Summers, R.W., Green, R.E., Proctor, R., Dugan, D., Lambie, D., Moncreiff, R., Moss, R., Baines, D., 2004. An experimental study of the effects of predation on the breeding productivity of capercaillie and black grouse. *Journal of Applied Ecology* 41, 513–524.

---

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het uiteindelijke doel van dit herintroductieproject is een duurzame vestiging van het korhoen in Het NPDHV en op de lange termijn een duurzaam herstel van een populatie in een reeks heidegebieden.

Om dit te bereiken is het primaire doel van dit project, achterhalen wat er met de korhoenders gebeurt die in Het NPDHV worden uitgezet. Ook de IUCN herintroductie richtlijnen (IUCN/SSC 2013), die Het NPDHV volgt bij de herintroductie van de Korhoen, stellen dat het monitoren van de vrijgelaten vogels van uiterst belang is en verplicht het om dit zo goed mogelijk te doen. Alleen met monitoren kan het succes of het falen van het herintroductie programma bepaald worden. Met hulp van de GPS data kan gezien worden of de korhoenders een voorkeur voor bepaalde gebieden in Het NPDHV hebben. Met deze informatie kan zo nodig het natuurbeheer gericht op de vogels worden ingezet. Verder kan bepaald worden of de vogels gedood worden in Het NPDHV of dat de vogels het gebied verlaten en daarom niet terug gezien worden. Deze gegevens zijn van cruciale belang om de toekomstige herintroductie zo nodig aan te passen.

Dode vogels kunnen aan hand van de laatste GPS positie sneller opgespoord worden. Daarbij kan hun lichaamsconditie bekeken worden om te zien hoe de geherintroduceerde dieren het in het gebied doen. Verder kan mogelijk de oorzaak van overlijden bepaald worden, gebrek aan voer of door een predator, en welke predator (havik/vossen). Deze informatie kan benut worden voor het beheer van Het NPDHV. De gegevens worden verzameld en bewerkt door zowel de Stichting NPDHV als ook door wetenschappers en studenten vanuit de Universiteit Utrecht.

Om deze doelen te halen wordt samengewerkt met specialisten van GPS onderzoek en zenderen van vogels (Sjoerd Dirksen Ecology; Prof. Naguib, Universiteit Wageningen; Dr. Hoodless en Dave Baines, internationale korhoenexpert, Game & Wildlife Conservation trust). Ook wordt eens in de 3 jaar kennis gedeeld via het International Grouse Symposium.

De Stichting NPDHV heeft meerdere jaren ervaring met het hanteren, fokken en vrijlaten van korhoenders. Dr. Goerlich-Jansson heeft 11 jaar ervaring in wetenschappelijk werken met vogels (veld en labora). Experts met ervaring van het aanbrengen van GPS zenders zijn gevraagd en bereid om bij de pilot studie mee te helpen.

IUCN/SSC (2013). Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission, viiii + 57 pp.

---

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Dit project dient ter natuurbescherming en het houden van bedreigde soorten. Onder natuurbescherming verstaat men het beschermen van bepaalde elementen van de natuur, in het bijzonder cultuur-historisch belangrijke of oorspronkelijke landschappen, bedreigde levensgemeenschappen, dier- en plantensoorten, biodiversiteit en natuurlijke hulpbronnen. Ook het tegengaan van bedreigingen en terugbrengen van een situatie in een oudere (oorspronkelijke) staat rekent men ertoe. Nederland heeft een lange geschiedenis van natuurbescherming, en meerdere organisaties houden zich bezig om de boven genoemde doelen te bereiken (bv Staatsbosbeheer, Vereniging Natuurmonumenten, Vogelbescherming Nederland).

De korhoen was bijna 30 jaar geleden een deel van de natuurlijke fauna van de Hoge Veluwe, die door o.a. humane activiteiten verdreven wordt. Dit project is een belangrijke stap, om het ecosysteem van Het NPDHV weer naar een natuurlijke staat te brengen, waarvan het korhoen een onderdeel is. Het korhoen is een ambassadeursoort waardoor een heel ecosysteem profiteert van maatregelen genomen vanuit het beheer gericht op het korhoen.

Dit project levert waardevolle data op, die onze kennis over het korhoen en hun soort-specifieke behoeftes verhoogd. Omdat populaties van korhoenders en soortgelijke vogels in heel Europa achteruit gaan, zou de kennis van dit project ook bij andere herintroductie programma's gebruikt kunnen worden. Dit project beantwoordt belangrijke vragen, zoals hoe benutten geherintroduceerde korhoenders hun nieuwe territorium, hoe is het verloop van exploratie en in hoe verre gaan vogels over de grenzen van het NPDHV? Is



er interactie van de uitgezette vogels, overlappen hun territoria? Wat is de meest voorkomende oorzaak van overlijden? In welke gebieden houden de vogels zich vooral op? Laten ze een voorkeur voor bepaalde structuren en flora zien? Alle deze parameters zijn belangrijk voor het opzetten van succesvolle herintroductieprojecten met het uiteindelijke doel van stabiele korhoen populaties, in Nederland en Europa.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

#### 3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

##### 1. Pilot experiment GPS zender

Hoewel er al veel ervaring is met het gebruik van GPS zenders bij vogels, willen wij toch dit project beginnen met het testen van de zenders bij korhoenders in gevangenschap. Dit is om te voorkomen, dat de zender de vogel in te grote mate hindert of zelf negatief beïnvloed.

De vogels worden een week lang geobserveerd om een soort basis gedrag te meten. Dan wordt de zender of als rugzak met een harnas of direct op de rug veren vastgezet. De precieze manier wordt nog in overleg met GPS experts bepaald, voor nu kijken wij naar zenders van ca. 3% lichaamsgewicht en een grootte van ca. 40x25x15mm.

Na het aanbrengen van de zender worden de vogels over een periode van vier weken geobserveerd. Als er geen aanwijzingen zijn van negatieve beïnvloeding door de zenders op de vogels (gemeten aan veranderingen in eet gedrag, lokomotie, lichaamsgewicht, activiteit), zullen de zenders voor de toekomstig vrijgelaten vogels gebruikt worden.

##### 2. GPS zender vrijgelaten korhoenders

Maximaal 20 van de 50 korhoenders die jaarlijks uitgezet worden, worden uitgerust met een GPS zender. De ontvangen gegevens worden regelmatig gecontroleerd. Er wordt vooral gekeken of het dier van positie verandert, omdat geen verandering in positie waarschijnlijk betekent dat het dier overleden is. De overlevende korhoenders worden zo lang gevolgd tot dat de batterij van de zender leeg is. Omdat vangen van de wilde korhoenders stress zou opleveren, wordt in eerste instantie ervoor gekozen, om de zenders op de vogel te laten. Als er een grote aantal vogels overleefd en de populatie groeit, wordt deze strategie in te toekomst nog eens overwogen. Maar voor nu zijn er te weinig vogels en het vangen van deze vogels te rechtvaardigen.

##### 3. Onderzoek overleden korhoenders (geen dierexperimentele handeling).

Als een korhoen overleden is, wordt het dier, zo snel als mogelijk, opgespoord en onderzocht op lichaamsgewicht, parasieten, en mogelijke oorzaken van overlijden. Verder worden er ook veren getrokken om de corticosteron waarden in de veren te bepalen. Corticosteron is verhoogd als het dier stressvolle ervaringen heeft gemaakt en veren van vogels in slechte lichaamsconditie zouden hogere waarden laten zien.

#### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

##### 1. Pilot experiment: korhoenders in gevangenschap worden voorzien van een GPS zender.

2. Korhoenders zenderen, vrijlaten en volgen: In gevangenschap opgegroeide korhoenders worden voorzien van een GPS zender. Na vrijlating worden de verplaatsingen van de vogels gevolgd.

3. Onderzoek van overleden korhoenders: Van overleden korhoenders wordt de conditie en doodsoorzaak bepaald, nadat ze zijn getraceerd (geen dierexperimentele handeling).

#### 3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het project begint met een pilot studie om de invloed van de GPS zender op gedrag en conditie van korhoenders in gevangenschap te testen. Hiervoor worden in gevangenschap gehouden korhoenders voorzien van een GPS zender en het gedrag en de conditie van de dieren gemonitord. Wanneer na gedetailleerde observatie gedurende 4 weken is vastgesteld dat het aanbrengen en dragen van de GPS zender geen welzijnsproblemen of andere hinder met zich meebrengt, wordt overgegaan tot het feitelijke onderzoek. Daartoe worden in gevangenschap opgegroeide korhoenders voorzien van GPS zenders en vrijgelaten. Vervolgens wordt aan hand van de door de GPS zender verzamelde gegevens de korhoenders gevolgd tot de dieren of overleden zijn of de batterij van de zender leeg is. Van tijdig teruggevonden dode korhoenders worden ook de lichaamsconditie en oorzaak van overleden onderzocht. Uiteindelijk wordt de verzamelde gegevens verwerkt en gebruikt voor het aanpassen van toekomstige populatiemanagement strategieën.

---

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Pilot experiment: Korhoenders in gevangenschap worden voorzien van een GPS zender
2	Korhoenders zenderen, vrijlaten en volgen: In gevangenschap opgegroeide korhoenders worden voorzien van een GPS zender. Na vrijlating worden de verplaatsingen van de vogels gevolgd.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Pilot experiment: Korhoenders in gevangenschap worden voorzien van een GPS zender |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om zeker te zijn, dat de gekozen GPS zender de korhoenders niet negatief beïnvloeden, wordt eerst een pilot project met korhoenders in gevangenschap uitgevoerd (Cuthill 1991). De aanvragers zijn in contact met meerdere gespecialiseerde bedrijven (Ecotone, madebytheo, pathtrack, Telemetry Solutions). Het formaat van de zender wordt ca. 40 x 25 x 15mm en in de literatuur wordt een zender met het gewicht van ca. 3% van het lichaamsgewicht voor zangvogels als optimaal gezien (Limosa), terwijl er geen goede wetenschappelijke onderbouwing voor deze getal is. Wel blijkt dat kleine, vliegende, vogels sterker worden beïnvloed dan grotere vogels (Barron et al. 2010). Korhoenders zijn grondlevende vogels. Het lichaamsgewicht van mannelijke korhoenders ligt tussen 820 - 1750g, van vrouwelijke tussen 750 - 1120g. Als richtlijn voor de zender wordt het laagste

gewicht (750g) aangehouden. Er bestaan geen studies over seizoensvariatie in lichaamsgewicht van korhoenders, en studies van vergelijkbare vogels (waaierhoenders, *Centrocercus urophasianus*) vinden of geen verschil (Hupp & Braun 1991) of tot 25% seizoensvariatie (Beck & Braun 1978). Als 20% variatie geschat wordt, kan de zender ca 18g wegen. Desondanks laat een recente meta-analyse zien, dat het gewicht van de zender het minst invloed heeft op gedrag en overleving van vogels (Barron et al. 2010), wij gaan daarom voor een gewicht van ca 20g of minder. Na goedkeuring van de aanvraag worden de zenders besteld.

Er bestaan verschillende manieren van bevestigen van zenders, om de nek, om de poten, op de veren, of als rugzak, bevestigd met een "harness" om de vleugels of om de poten. In de literatuur worden rugzakken bij verschillende vogelsoorten gebruikt (Limosa Bird Tracking; Fijn et al 2012; Thaxter et al. 2014). Of de zenders het welzijn van vogels aantasten is niet duidelijk uit de literatuur, omdat het sterk van de soort vogel en soort bevestiging afhankelijk is (Costantini & Moller 2013; Barron et al. 2010). Dat maakt het doorvoeren van een pilot studie belangrijk.

In deze pilot wordt, in overleg met bedrijven en experts, voor één manier van bevestiging gekozen en getest, waarbij de voorkeur naar de rugzak en harness gaat. De harness bestaat meestal uit elastieken welke met teflon omgeven zijn. Deze banden worden om de vleugels en over de borst of de poten van de vogel gelegd en houden zo de zender op de rug vast (voorbeelden in Bedrosian & Craighead 2010; Fijn et al. 2012; Thaxter et al 2014).

Na keuze van een zender worden de vogels een week van tevoren, en gedurende vier weken na het aanbrengen van de zender in hun thuishoeden geobserveerd. Als er geen aanwijzingen zijn dat de vogels negatief worden beïnvloed (gemeten aan abnormaal gedrag, proberen de zender eraf te halen (> 48 uur), vermindering in eet gedrag, beweging, lichaamsgewicht, activiteit), zal de zender voor de toekomstig vrijgelaten vogels gebruikt worden.

Blijkt dat de zender en de bevestiging de vogel wel negatief beïnvloed, zou er in overleg met experts een andere manier van bevestiging gekozen worden, bv door de slingers van het harnas anders te plaatsen (Bedrosian & Craighead 2010; Thaxter et al. 2014).

Blijkt dat een harnas helemaal niet geschikt is, wat niet verwacht wordt, dan kan de zender direct op de veren van de rug geplakt worden (Fijn et al. 2012). Deze manier van bevestigen wordt dan in een tweede pilot studie, met dezelfde opzet (gedragsobservaties, 5 mannelijke, 5 vrouwelijke dvogels), getest worden. Deze pilot zoude dezelfde dieren gebruiken. Als er blijkt, dat er ook problemen met deze manier van bevestiging van de zender is, moet overwogen worden, naar invasieve methoden te kijken (implantatie; hiervoor zoude een nieuwe aanvraag ingediend worden) of met het bezenderen te stoppen.

De pilot studie vindt plaats zodra de aanvraag goedgekeurd is, dus deze studie is gepland in het voorjaar 2016. Het voordeel van de pilotstudie uitvoeren in het voorjaar, is dat de dieren actiever zijn dan in de winter periode. De vogels die in de pilot worden gebruikt, broeden niet, maar worden later in het jaar uitgezet (zie dierproef 2).

Barron, D.G., Brawn, J.D., Weatherhead, P.J. 2010. Meta-analysis of transmitter effects on avian behaviour and ecology. *Methods in Ecology and Evolution* 1, pp. 180–187.

Beck, T.D.I. & Braun, C.E., 1978. Weights of Colorado Sage Grouse. *The Condor* 80(2), pp. 241-243.

Bedrosian, B., Craighead, D. J. 2010. Solar powered GPS transmitter use on sage-grouse: methods of attachment, influences on survival, and success rates of the transmitters.

Costantini, D., Pape Møller, A., 2013. A meta-analysis of the effects of geolocator application on birds. *Current Zoology* 59, 697–706.

Fijn, R.C., Boudewijn, T.J., Poot, M.J.M. 2012. Long-term attachment of GPS loggers on Great Cormorant proved unsuitable on a captive bird. *SEABIRD* 25, pp. 54–60.

Thaxter, C.B., Ross-Smith, V.H., Clark, J.A., Clark, N.A. 2014. A trial of three harness attachment methods and their suitability for long-term use on Lesser Black-backed Gulls and Great Skuas, *Ringling & Migration*, 29(2) pp. 65-76.

Hupp, J.W. & Braun, C.E. 1991. Geographic Variation among Sage Grouse in Colorado. *The Wilson Bulletin* 103(2), pp. 255-261.

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

Het aanbrengen van de GPS zender wordt met minstens drie mensen uitgevoerd. De korhoenders worden met netten in hun thuiskooi gevangen. Een person houdt de vogel vast, twee brengen het harnas en de zender aan. Op basis van de literatuur kiezen wij met voorkeur voor het aanbrengen van de rugzak met twee slingers rondom de vleugels ("wing harness", zie ook Thaxter et al. 2012), omdat deze manier van bevestigen het minst invloed op de vogel blijkt te hebben.

Voordat de zender wordt vastgezet, wordt de vogel gewogen en gemeten, om later mogelijke veranderingen in deze parameters door de zender te bepalen. De hele procedure duurt maximaal 15 minuten, waarna de vogel weer in zijn kooi wordt vrijgelaten. Vervolgens worden de korhoenders gedurende 4 weken regelmatig geobserveerd. Indien mogelijk worden de dieren elke week gewogen zonder te hanteren (weegschaal in de kooi). Na vier weken worden alle vogels weer gevangen en hun lichaamsconditie en de toestand van de veren onderzocht. Als er geen indicaties zijn om de zender van de vogel eraf te halen (dus geen last van de zender, geen problemen met gedrag, verenkwiteit), zoude de zenders op de vogels blijven totdat deze later in het jaar in het park worden vrijgelaten.

Als in de pilot blijkt dat een rugzak met harnas toch negatieve invloed op de korhoenders heeft, kan de harnas ook om de poten vastgemaakt worden (Bedrosian & Craighead. 2010). Blijkt er, tegen verwachting in, dat beide manieren niet geschikt zijn, kan de zender ook op de rugveren geplakt worden, met hulp van tape (Fijn et al 2012). De procedure is ongeveer gelijk als voor de rugzak beschreven. Zowel bevestiging om de poten als opplakken zoude weer met dezelfde vogels gebeuren en ook weer door gedragsobservaties en bijhouden van veren- en lichaamsconditie onderzocht worden.

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

Baserend op de literatuur, worden er geen sterke effecten van de zender op de korhoenen verwacht. Maar doordat de dieren aan het begin en aan het eind van de proef worden gemeten, wordt de power van de analyse verhoogd en kan de invloed van de zender beter ingeschat worden. Berekend op basis van een poweranalyse waarbij gewichtsverandering als uitleesparameter gehanteerd wordt, zijn er 4 vogels nodig. Omdat er verschil in effect op mannelijke en vrouwelijke vogels kan zijn, (lichaamsgewicht mannen 820 - 1750g, 750 - 1120g vrouwen) is het wenselijk om 4 vogels per sekse te gebruiken. Omdat voor de gedragsparameter geen data bestaan en de effecten nog minder sterk zouden kunnen zijn, zullen 5 dieren per sekse gebruikt worden.

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Dit onderzoek wordt uitgevoerd met korhoenders (*Tetrao tetrix*). De dieren komen uit eigen fok van de Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe (NPDHV). Gebruikt worden 5 mannelijke en 5 vrouwelijke korhoenders. Omdat gekeken moet worden, of de vogels negatief worden beïnvloed door de zender, moet dit pilotproject ook met korhoenders uitgevoerd worden. Omdat vrouwelijke en mannelijke vogels in lichaamsgewicht en gedrag verschillen, zou de zender met beide geslachten getest worden.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Na literatuur onderzoek (Google scholar, web of science, SOVON Limosa bird tracking) blijkt dat (radio)zenders al vaker gebruikt worden, ook bij korhoenders. Deze zenders zijn echter niet te vergelijken met de hier voorgestelde zenders, omdat radiozenders om de nek worden gedragen en de GPS zenders nu veel lichter zijn. Daarom is voor dit pilotproject gekozen, welke dient ter verfijning van de methoden van het bevestigen van GPS zenders als rugzak met een harnas bij korhoenders. Bij de vogels in gevangenschap wordt de manier van aanbrengen van een zender getest, en gekeken hoe deze zender en het harnas het dier over een langere tijdsperiode beïnvloed. Door uitvoering van deze pilot worden de methoden geoptimaliseerd voor het hoofdproject, waarbij korhoenders worden gezenderd voordat ze worden vrijgelaten. Door de intra-individuele metingen kan het effect van de zender nauwkeuriger worden ingeschat en zijn zo minder vogels nodig in vergelijking tot een opzet met twee groepen van vogels.

Vervanging is in dit project niet van toepassing.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Op basis van de literatuur wordt geen pijn of lijden verwacht. Het kan wel zijn, dat de vogel kort na het aanbrengen van de zender zich angstiger gedraagt of probeert de zender eraf te halen, maar wij verwachten dat dit, als dit zou gebeuren, maar een-twee dagen duurt. De vogels worden dagelijks gecontroleerd en gedurende de eerste week na het aanbrengen van de zender dagelijks ende daarop volgende drie weken 3 keer in de week, geobserveerd.

Wordt er gezien dat de vogel over een langere periode (>4 dagen) abnormaal gedrag (ziekte verschijnsel, inactiviteit) vertoont, dan wordt de zender verwijderd.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

In 2007 is door de Raad van State uitspraak gedaan waarbij de rechtmatigheid van het project is erkend (LJN: AZ9015, Raad van State, 200604241/1). De dieren worden gehuisvest in kooien van ca. 7 \* 5 \* 2 min groepen van een mannetje met twee vrouwtjes. De vogels krijgen geschikte vogelvoer en vers voer uit de natuur. De verzorgers hebben de nodige expertise en ervaring en vernieuwen deze jaarlijks op internationale congressen

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe

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

In 2007 is door de Raad van State uitspraak gedaan waarbij de rechtmatigheid van het project is erkend (LJN: AZ9015, Raad van State, 200604241/1). De Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe fokt al sinds 2007 succesvol korhoenders. De verzorgers hebben de nodige expertise en ervaring en vernieuwen deze jaarlijks op internationale congressen.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.



Ja

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hindering van de natuurlijke bewegingen van het dier. Stress door het onbekende gewicht van de zender.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het aanbrengen van de zender.

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

Na uitwisseling met experts (collega's en bedrijven die zenders maken) wordt de voor korhoenders meest geschikte zender uitgezocht. De voorkeur gaat naar een zender die op de rug met banden om de vleugels wordt bevestigd, een maat van ca. 40 x 25 x 15mm heeft, en een gewicht van ca. 20g.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht ongerief door vangen, meten en bevestigen van de zender (15 minuten) en het wennen aan de zender (ca. 1 dag).

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 2          | 1. Korhoenders zenderen, vrijlaten en volgen: In gevangenschap opgegroeide korhoenders worden voorzien van een GPS zender. Na vrijlating worden de verplaatsingen van de vogels gevolgd. |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Maximaal 20 van de 50 korhoenders die jaarlijks worden uitgezet in Het Nationale Park De Hoge Veluwe (NPDHV), worden uitgerust met een GPS zender. De ontvangen data worden regelmatig gecontroleerd en er wordt vooral gekeken of het dier van positie verandert, omdat geen verandering in positie waarschijnlijk betekent dat het dier overleden is. De overlevende korhoenders worden zo lang als mogelijk gevolgd. De primaire uitkomstparameter zijn dus de positie meldingen van de GPS zender.

De GPS gegevens zijn nodig, om te onderzoeken, of de toegepaste maatregelen van landschapsbeheer tot hoger overleving en broedsucces van de korhoenders leiden. Als dit

niet het geval is, moet Het NPDHV overwegen om de herintroductie te stoppen. Om deze beslissing te nemen, moeten data uit minsten drie jaren verzameld worden, om zo voor natuurlijke variatie in overleving door bv. klimaatomstandigheden te corrigeren. Als er geen buitengewone weersomstandigheden voorkomen, zou naar drie jaren een evaluatie van het succes van de herintroductie gemaakt worden en eventuele aanpassingen overwogen worden.

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

De korhoenders worden ca twee weken voordat ze worden vrijgelaten met de GPS zender voorzien. Zo kunnen mogelijke problemen met de bevestiging van de zender nog geobserveerd worden. De vogel wordt met een net gevangen en ca 15 minuten gefixeerd (zie behandelingen bijlage 1). Tijdens deze periode worden ook metingen van gewicht en lengte van de tarsus genomen. Ook wordt er een startveer geknipt om corticosteron, het aviaire stresshormoon, te bepalen.

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

Smit (2003) suggereerde in een haalbaarheidsstudie dat een jaarlijks aantal van minimaal 30 vogels voor een periode van minimaal 6 jaarnoodzakelijk is om een 50% kans op overleving en vestiging via reproductie te krijgen van uitgezette vogels.

Het aantal gezenderde dieren is geschat op basis van de literatuur en ervaring van het Management van Het NPDHV. Tot nu toe wordt geschat dat ca. 5% van de vrijgelaten vogels overleeft. Dat zou van 20 vogels met GPS zender één vogel zijn. Er is echter een grote kans dat dit een foute inschatting is, omdat de dieren die het gebied verlaten niet meer gezien kunnen worden.

## **B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Dit onderzoek gaat over korhoenders (*Tetrao tetrix*). De dieren komen uit eigen fok van de Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe en worden vrijgelaten op een leeftijd tussen de 0 en 1. Er zullen per jaar 20 vogels gezenderd worden, over vijf jaar zijn dat 100 vogels (inclusief 10 vogels van de pilot studie).

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

10 van de vrijgelaten korhoenders waren in de pilot studie al langer (>6 weken) voor het vrijlaten met een zender voorzien. Zei hebben door het hanteren voor wegen licht ongerief beleefd, maar er bestaat geen reden, om deze vogels niet vrij te laten.

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de

keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Om de methode te verfijnen, wordt er vooraf aan dit projectdeel een pilot project uitgevoerd om te bepalen of de zender invloed heeft op het gedrag van de vogels. Vervanging is in dit onderzoek niet van toepassing omdat het om de territorium benutting van de korhoen in Het NPDHV gaat.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De korhoenders worden ca. twee weken voor vrijlating met de zender uitgerust. Zo kunnen problemen nog op tijd herkend worden.

De door de GPS zender ontvangen data worden regelmatig gecontroleerd en er wordt vooral gekeken of het dier van positie verandert, omdat geen verandering in positie waarschijnlijk betekent dat het dier gewond of overleden is. Bij geen verandering van positie wordt het dier zo snel als mogelijk opgespoord.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

In 2007 is door de Raad van State uitspraak gedaan waarbij de rechtmatigheid van het project is erkend (LJN: AZ9015, Raad van State, 200604241/1). De dieren worden gehuisvest in kooien van ca. 7 \* 5 \* 2 min groepen van een mannetje met twee vrouwtjes. De vogels krijgen geschikte vogelvoer en vers voer uit de natuur. De verzorgers hebben de nodige expertise en ervaring en vernieuwen deze jaarlijks op internationale congressen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe

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

In 2007 is door de Raad van State uitspraak gedaan waarbij de rechtmatigheid van het project is erkend (LJN: AZ9015, Raad van State, 200604241/1). De Stichting Het Nationale

Park De Hoge Veluwe fokt al sinds 2007 succesvol korhoenders. De verzorgers hebben de nodige expertise en ervaring en vernieuwen deze jaarlijks op internationale congressen.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hindering van de natuurlijke bewegingen van het dier. Stress door het onbekende gewicht van de zender.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het aanbrengen van de zender.

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

De korhoenders worden ca. twee weken voor vrijlating met de zender uitgerust. Zo kunnen problemen nog op tijd herkend worden.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als er een gewond korhoen gevonden wordt, bestaat de mogelijkheid, de vogel in gevangenschap te verzorgen. Het zijn echter wilde dieren, dus moet er, op basis van de zwaarheid van de verwonding en de geschatte overlevingskans, gekozen worden tussen gevangenschap en euthanasie.

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

Geschat 1-5%, omdat gewonde vogels waarschijnlijk snel door een predator gevonden worden.

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht ongerief door vangen, meten en bevestigen van de zender (15 minuten) en het wennen aan de zender (ca. 1 dag).

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.818.021
2. Titel van het project : Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe
3. Titel van de NTS : Het korhoen komt terug naar het Nationale Park de Hoge Veluwe

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 25-01-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 03-02-2016 en 02-03-2016
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 15-02-2016 tot 19-02-2016
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 17-03-2016

## 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 15-02-2016
- Strekking van de vraag / vragen:  
Formulier projectaanvraag
- 1c: De DEC denkt dat het goed zou zijn om de naam van Mw. Ohl te vervangen voor de huidige nieuwe groepsleider



### Projectvoorstel

- 3.2, doel: De DEC raadt u aan om duidelijk te noemen dat de IUCN richtlijnen stellen dat het verplicht is de herintroductie zo goed mogelijk te monitoren, omdat dit het belangrijkste argument is om deze proef uit te voeren. Graag aanpassen.
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC stelt als voorwaarde dat het tuigje dat u gebruikt om de zender te bevestigen van het type is dat na een bepaalde tijd automatisch breekt. De levensduur van het tuigje dient natuurlijk wel langer te zijn dan die van de batterij.

- Datum antwoord: 19-02-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):

### Formulier projectaanvraag

- 1c: Is veranderd, Dr. Wouter Dhert is de ad interim vervanger voor Prof. Ohl

### Projectvoorstel

- 3.2, doel: Is in de tekst opgenomen en de referentie voor de IUCN guidelines is aangepast op de laatste versie: IUCN/SSC (2013). Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission, viiii + 57 pp.

' Om dit te bereiken is het primaire doel van dit project, achterhalen wat er met de korhoenders gebeurt die in Het NPDHV worden uitgezet. Ook de IUCN herintroductie richtlijnen (IUCN/SSC 2013), die Het NPDHV volgt bij de herintroductie van het korhoen, stellen dat het monitoren van de vrijgelaten vogels van uiterst belang is en verplichten het om dit zo goed mogelijk te doen. Alleen met monitoren kan het succes of het falen van het herintroductie programma bepaald worden. Met hulp van de GPS data kan gezien worden of de korhoenders een voorkeur voor bepaalde gebieden in Het NPDHV hebben. Met deze informatie kan zo nodig het natuurbeheer gericht op de vogels worden ingezet. Verder kan bepaald worden of de vogels gedood worden in Het NPDHV of dat de vogels het gebied verlaten en daarom niet terug gezien worden. Deze gegevens zijn van cruciaal belang om de toekomstige herintroductie zo nodig aan te passen. '

- 3.4, onderzoeksstrategie: De aanvrager heeft het voorstel van de DEC overwogen, maar denkt niet, dat een afbreekbaar tuigje in dit project van toepassing is. Er is gekozen voor een zender met solarcellen, welke de batterijduur verhogen, tot mogelijk vijf jaren (pathtrack). De lange duur is gericht gekozen, omdat het doel van dit project een langdurig vestiging van het korhoen is. Omdat er geen (lange termijn) gegevens bestaan, is elke vogel met zender een waardevolle bron van informatie. Data over meerdere jaren zouden waardevol zijn, vooral met betrekking tot de bepaling van het succes of het falen van het project. Verder wordt er verwacht, dat het meeste ongerief wordt veroorzaakt aan het begin van het dragen van de zender (door ongewoon gewicht en hindering). Na korte tijd zullen de vogels eraan wennen en zal het ongerief omlaag gaan. Daarom acht de aanvrager, na afweging van het nut van

data over meerdere jaren en het ongerief voor het dier, het als verantwoord, de zender zo lang als mogelijk op de vogel te laten. Er bestaan voldoende middelen, zowel mensen als geld, om de vogels over de komende jaren te volgen.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

#### 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

#### 1. Het project is mogelijk vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).

De DEC-Utrecht twijfelt over de vraag of het hier om een dierproef in de zin der wet gaat. Het betreft hier korhoenders die in gevangenschap gefokt zijn en die worden gehouden in grote vliegkooien. De dieren worden in gevangenschap al zo gehuisvest dat ze optimaal voorbereid zijn op uitzetting in het wild. Dit betekent onder andere dat ze zo min mogelijk worden gehanteerd. Voordat ze worden uitgezet op de Hoge Veluwe worden alle dieren gevangen en wordt een deel daarvan uitgerust met een GPS-zender. Het onderzoek richt zich op het beantwoorden van een wetenschappelijke vraag die samenhangt met het behoud van de betreffende diersoort. Er worden echter geen invasieve handelingen verricht en de dieren ondervinden vrijwel zeker geen ongerief van het aanbrengen van de zenders dat uitstijgt boven het in de Wet op die dierproeven genoemde criterium ( $\geq$  het inbrengen van een naald). De DEC realiseert zich dat dit oordeel over het ongerief voor discussie vatbaar is, maar wijst er op dat bijvoorbeeld het aanbrengen van pootringen in deze zelfde context ook niet zou worden gezien als een dierproef. Het vangen, hanteren en uitzetten van de dieren, of ze nu wel of niet worden uitgerust met een zender, is naar de mening van de DEC op zichzelf geen dierproef, ondanks het feit dat aan een leven in het wild voor de dieren risico's verbonden zijn. Ook de aanvrager is kennelijk die mening toegedaan, want de aanvrager vraagt slechts vergunning voor de dieren die met een zender worden uitgerust.

De DEC is van mening dat over de vraag of hier sprake is van een dierproef een principe-besluit dient te worden genomen met in achtneming van andere, vergelijkbare aanvragen. De DEC beschikt echter niet over een overzicht daarvan. De andere aanvragen die de DEC wel bekend zijn betreffen wilde dieren die in het wild worden gevangen en dan van een zender worden voorzien en weer losgelaten.

Het resterende deel van dit advies is gebaseerd op de aanname dat er toch sprake is van een dierproef.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.

uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.

uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.

X wettelijk vereist. Dit onderzoek is weliswaar niet wettelijk vereist volgens de Nederlandse wet of Europese richtlijnen, maar het herintroductieprogramma voor korhoenders is wel getoetst aan de aanwijzingen van de *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), waarin richtlijnen voor dit type monitoringstudies bij herintroducties zijn opgenomen.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het belang wordt ingeschat als reëel.

Dit project vormt een belangrijk onderdeel van natuurbescherming en het behoud van soorten. Het korhoen behoorde tot ongeveer 30 jaar geleden tot de natuurlijke fauna van de Hoge Veluwe. Vooral door menselijke activiteiten is de soort hier, en later ook elders in Nederland uitgestorven. Natuurbescherming omvat onder meer het behouden of herstellen van cultuur-historisch belangrijke of oorspronkelijke landschappen met daarin voor die landschappen kenmerkende en ecologisch essentiële flora- en fauna-elementen. Het herintroduceren van korhoenders op de Hoge Veluwe past daarin.

Een belangrijke voorwaarde voor het slagen van herintroductieprogramma's vormt de mogelijkheid tot monitoring van de uitgezette dieren. Hoe maken ze gebruik van het hun geboden areaal, hoe kunnen dode dieren worden opgespoord en de doodsoorzaak worden vastgesteld, migreren de dieren ook naar andere biotopen, zijn allemaal belangrijke vragen voor het welslagen van dit type programma's. De richtlijnen van de IUCN voor herintroductieprogramma's stellen dat monitoring van de dieren na uitzetting en een wetenschappelijke evaluatie van de resultaten (die ook gepubliceerd dient te worden) noodzakelijk zijn.

De kennis en ervaringen die met dit project worden opgedaan zullen ook waardevol blijken voor andere herintroductieplannen en het vaststellen van de juiste beheersmaatregelen.

4. Dit project is gericht op de herintroductie van het korhoen in het Nationaal Park Hoge Veluwe (NPHV).

Uit de projectbeschrijving blijkt duidelijk dat de onderzoeker zich bewust is van de problemen en valkuilen die gepaard gaan met de herintroductie van verdwenen diersoorten zoals het korhoen. Deze kennis is gebaseerd op (negatieve) ervaringen met het uitzetten van korhoenders elders in Nederland en een uitgebreide set van internationale gegevens, b.v. uit soortgelijke projecten in Schotland en Polen waar succesvolle programma's zijn of worden uitgevoerd. De DEC-Utrecht verwacht dan ook dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zullen leiden

tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project, mede door het feit dat het NPHV een gebied van voldoende omvang is en het geschikte habitat voor het korhoen biedt, dit laatste ondersteund door effectieve beheersmaatregelen.

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

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

Dit project betreft korhoenders. De dieren worden in gevangenschap gefokt en dan gehuisvest in grote vliegkooien. Er is echter geen sprake van het vangen van dieren uit het wild. Alvorens ze worden uitgezet maken ze, weer volgens de richtlijnen van de IUCN, een gewenningsprogramma door waarin de dieren 'geleerd' wordt voedsel en water te vinden en predators te vermijden. Het gebruik van deze bedreigde diersoort is in deze context onvermijdelijk en vormt geen bedreiging voor bestaande natuurlijke populaties.

6. Het ongerief (als gevolg van de dierproeven) is realistisch ingeschat: zeer gering tot nihil.

Op de dieren wordt een GPS-zendertje bevestigd. Dit kan op verschillende manieren gebeuren. Opplakken geeft de minste kans op ongerief, maar is minder geschikt omdat de zender afvalt bij het ruien. Daarom zal gekozen worden uit diverse vormen van tuigjes (rugzak of harness) om de zender te bevestigen. Er is veel ervaring met het zenderen van vogels op deze wijze. In overleg met experts zal de keuze gemaakt worden voor een van de beschikbare mogelijkheden. In een pilot zullen 5 hanen en 5 hennen worden uitgerust met rugzak, dan wel harness en gedurende 4 weken geobserveerd worden. Deze pilot zal in zijn geheel uitgevoerd worden bij dieren die in gevangenschap gehuisvest zijn in de grote vliegkooien. Wanneer blijkt dat de dieren hiervan geen of slechts zeer geringe hinder ondervinden zullen jaarlijks 20 dieren op deze wijze met een zender worden uitgerust en uitgezet.

De reden dat de DEC twijfelt over de vraag of het hier een dierproef betreft, is het feit dat de dieren vrijwel zeker geen hinder zullen ondervinden en ook geen invasieve ingrepen in het programma zijn opgenomen. Een geringe mate van ongerief is mogelijk te verwachten tijdens en kort na het aanbrengen van het tuigje. De dieren zullen er even aan moeten wennen. De zenders zullen ongeveer 20 gram wegen (op een lichaamsgewicht van 750-1850 gram).

De DEC heeft met de onderzoeker overlegd over de mogelijkheid om zo een tuigje te kiezen dat zo geconstrueerd is dat het na verloop van tijd (als de batterij is uitgeput) afvalt en de dieren niet levenslang een niet-werkende zender om zullen hebben. In antwoord daarop is gemeld dat

de zenders voorzien zullen zijn van een zonnecel waardoor de accu op sterkte blijft voor een periode van tenminste vijf jaar en de dieren dus over een langere tijd gevolgd kunnen worden. Gezien de (natuurlijke) overlevingskansen van de dieren in die periode acht de DEC dit een waardevolle toevoeging aan het project. Het is dus bij nader inzien niet wenselijk dat het tuigje na verloop van tijd vanzelf breekt.

De DEC realiseert zich dat de korhoenders die worden uitgezet, of ze nu wel of niet een zender dragen, substantiële risico's lopen die onlosmakelijk verbonden zijn met een leven in het wild. Het uitzetten kan daarom met het nodige ongerief gepaard gaan. De andere kant van de medaille is dat het om wilde dieren gaat die op deze wijze in staat worden gesteld om een zelfstandig leven te leiden in een voor de soort geschikte habitat. Dat is zonder enige twijfel een verrijking voor de dieren.

Of het ethisch aanvaardbaar is om de dieren aan de risico's van herintroductie bloot te stellen dient zorgvuldig te worden getoetst. Voor dit soort herintroducties bestaan richtlijnen van de IUCN die onder andere voorschrijven dat de dieren slechts mogen worden uitgezet in een geschikte habitat en nadat ze in gevangenschap goed zijn voorbereid op de omstandigheden die ze zullen aantreffen. Die toetsing is echter niet aan de DEC. De DEC heeft geen reden om aan te nemen dat men onzorgvuldig te werk zal gaan.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen.  
De gestelde vragen in dit onderzoek zijn alleen te beantwoorden door onderzoek met korhoenders, gefokt onder semi-natuurlijke condities.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.  
Daar waar variabelen in de uitleesparameters bekend zijn is een poweranalyse toegepast en zijn de juiste statistische methoden van toepassing.  
Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven vrijwel geen ongerief zullen opleveren.  
Er is slechts sprake van een positief milieueffect.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de overwegingen in deel C komt de DEC-Utrecht tot de volgende afweging over de ethische toelaatbaarheid van het project.

De doeleinden van het project rechtvaardigen naar de mening van de DEC-Utrecht het gevraagde gebruik van de korhoenders. Het, in de ogen van de DEC zeer beperkte ongerief voor de dieren (omdoen van, en gewenning aan het dragen van het tuigje) wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat. Uit wetenschappelijk oogpunt wordt dit onderzoek verantwoord geacht en het is zeer waarschijnlijk dat de doeleinden zullen worden gehaald binnen de gestelde tijd. De resultaten worden van belang geacht voor het succesvol herintroduceren van korhoenders in het NPHV en kunnen ondersteunend zijn voor andere introductieprogramma's. Afhankelijk van de omvang van de korhoenpopulatie zullen dieren naar andere biotopen migreren. Ook dan is het van belang de dieren te kunnen volgen middels de GPS-waarnemingen.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC-Utrecht adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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  
AVD108002016483

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016483. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur





Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe  
Titel niet-technische samenvatting: De korhoen komt terug naar de Hoge Veluwe  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.187,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 18 maart 2016

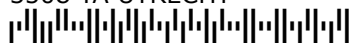


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC

Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**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  
AVD108002016483

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700483

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002016483	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Tomas, F.M.D. (Francesca)**

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 9 mei 2016 16:02  
**Aan:** 'DEC-Utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD108002016483

Geachte DEC Utrecht,

Op 18-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe' met aanvraagnummer AVD108002016483.

De CCD heeft de aanvrager een aantal aanvullende vragen gesteld:

1: U huisvest de dieren tijdelijk in een soft release kooi in het proefgebied. Daarmee is de huisvesting en verzorging van de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU en worden de proeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt. De CCD kan alleen toestemming geven voor het afwijken van deze twee bepalingen als er een geldige motivatie op wetenschappelijke gronden voor gegeven wordt. Kunt u hiervan de motivatie geven?

2: U refereert naar een rechtszaak waarin de rechtmatigheid van het project wordt bevestigd. Kunt u aangeven wat de kern van de rechtszaak was en de relatie met de twee vragen over afwijking in verzorging en afwijking in de huisvesting van de Wod?

De vergunning is toegewezen zoals aanvgevraagd

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

**bezoekadres**  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

**postadres**  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

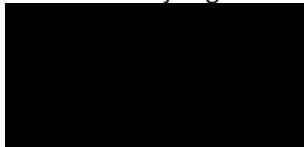
uw kenmerk  
ons kenmerk

**datum** 13 april 2016  
**onderwerp** Antwoorden AVD108002016483

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 12 april 2016.

Met vriendelijke groet



Wim de Leeuw  
Hoofd Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

Geachte meneer, mevrouw,

Dank u voor uw vragen, hieronder de nadere toelichting:

**Vraag huisvesting:**

U huisvest de dieren tijdelijk in een 'soft release kooi' in het proefgebied.

Daarmee is de huisvesting en verzorging van de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU en worden de proeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt

De CCD kan alleen toestemming geven voor het afwijken van deze twee bepalingen als er een geldige motivatie op wetenschappelijke gronden voor gegeven wordt. Kunt u hiervan de motivatie geven?

**Reactie:**

Voor een succesvolle herintroductie is het belangrijk, dat de dieren zo min mogelijk stress ervaren en in goede conditie zijn (Teixeira et al. 2007). Om dit te waarborgen, is De Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe (NPHV) in 2001 begonnen, om zelf korhoenders te fokken. Deze vogels zouden in de toekomst in het park vrijgelaten worden.

Een voordeel van het fokken en huisvesten van de dieren op locatie is het verkorten van transport routes en zo de vermindering van stress ervaren door de vogels (Teixeira et al. 2007). Tijdens transport kunnen de vogels licht tot ernstig ongerief ervaren, dit kan zelfs tot overlijden leiden (Mitchell & Kettlewell 1998).

Verder zullen de korhoenders zo min mogelijk aan mensen en de omstandigheden in gevangenschap gewend raken, en wordt hun natuurlijke gedrag zo min mogelijk beïnvloed.

Twee weken voordat de korhoenders worden vrijgelaten, worden zij in de 'soft-release' -kooien geplaatst. Deze kooien staan in het veld en dienen de transitie van gevangenschap naar het wild van de vogels te faciliteren (Mitchell et al. 2011). De vogels kunnen in de 'soft-release'-kooien al aan hun omgeving en het voedsel wennen (de kooien zijn voorzien van de natuurlijke vegetatie). Op deze locatie kan dus ook beter onderzocht worden in welke mate de vogels ongerief ervaren van de zender. De omgeving in de 'soft-release'-kooi is namelijk hetzelfde als de leefomgeving van het gebied waar ze uiteindelijk in vrijheid zullen leven.

Aangezien wij metingen doen aan deze dieren, juist om het verloop van het uitzettingsproces te monitoren kunnen wij niet anders dan werken met de dieren op locatie onder de beschreven huisvestingsomstandigheden. Bij dit praktijk-experiment, waarbij wij metingen doen aan de doeldieren, zou huisvesting op een proefdierlocatie de vraagstelling teniet doen.

Mitchell MA, Kettlewell PJ. 1998. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems! *Poult Sci* 77: 1803–1814.

Mitchell AM, Wellicome TI, Brodie D, Cheng KM. 2011. Captive-reared burrowing owls show higher site-affinity, survival, and reproductive performance when reintroduced using a soft-release. *Biological Conservation* 144: 1382–1391.

Teixeira CP, de Azevedo CS, Mendl M, Cipreste CF, Young RJ. 2007. Revisiting translocation and reintroduction programmes: the importance of considering stress. *Animal Behaviour* 73: 1-13.

**Vraag rechtszaak:**

U refereert naar een rechtszaak waarin de rechtmatigheid van het project wordt bevestigd. Kunt u aangeven wat de kern van de rechtszaak was en de relatie met de twee vragen over afwijking in verzorging en afwijking in de huisvesting van de Wod?

**Reactie:** de kern van de rechtszaak was het volgende:

Een beroep van de Faunabescherming tegen het 'in de vrije natuur uitzetten van gefokte korhoenders in het gebied van Het Nationaal Park De Hoge Veluwe' door Stichting Nationaal Park de Hoge Veluwe. Daarbij ging het onder andere over geschiktheid van het beoogde leefgebied voor de korhoenders en mogelijke genetische vermenging met de inheemse korhoenderpopulatie op de Sallandse Heuvelrug.

De uitspraak was als volgt: Bij besluit van 1 maart 2005 heeft de minister aan Stichting Het Nationale Park De Hoge Veluwe ontheffing verleend voor het in de vrije natuur uitzetten van gefokte korhoenders (*Tetrao tetrix*), ten behoeve van de herintroductie in het gebied van het Nationale Park De Hoge Veluwe.

<http://jure.nl/ECLI:NL:RVS:2007:AZ9015>.

Op het moment dat deze uitspraak is gedaan was de Wod niet in beeld omdat het op dat moment niet om een dierproef ging in de zin van de wet. Daarmee is huisvesting dus niet getoetst aan de Wod.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

████████████████████





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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

AVD108002016483

**Bijlagen**

1

Datum 4 mei 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe" met aanvraagnummer AVD108002016483. Op 4 april 2016 heeft u aanvullende informatie gestuurd. Het betrof uitleg over het afwijken van huisvestingsrichtlijnen en een inhoudelijke verheldering omtrent een rechtzaak die er in het verleden gevoerd is. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe" starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 april 2016 tot en met 1 april 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie en dat van uw aanvullingen. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Daarnaast worden aanvullende voorwaarden gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv 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: Universiteit Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Bezenderen van korhoenders in de Hoge Veluwe" met aanvraagnummer AVD108002016483, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De naam van de verantwoordelijk onderzoeker staat in het aanvraagformulier genoemd.

Voor de uitvoering van het project is Beleidsmedewerker verantwoordelijk.  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Pilot experiment: Korhoenders in gevangenschap worden voorzien van een GPS zender	Andere vogels (andere Aves) / Korhoenders, een zeer bedreigde en middels diverse richtlijnen beschermde soort.	10	Licht	
2: Korhoenders zenderen, vrijlaten en volgen	Andere vogels (andere Aves) / korhoenders	100	Licht	Er is geen sprake van herhaling omdat de dieren uit bijlage 1 gebruikt moeten worden. er zijn niet zomaar meer dieren beschikbaar. Daarnaast worden er aan de dieren uit bijlage 1 geen extra handelingen verricht in bijlage 2. De aanvrager geeft aan dat er een humaan eindpunt is, maar tegelijkertijd wordt dit niet als onderdeel van het dierexperiment gezien.

#### Voorwaarden

##### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

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

Uit artikel 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.







22 MAART 2016

ARD 10500 2016 484

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Rijksuniversiteit Groningen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>1 1 7 9 0 3 7</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7									
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>A, Deusinglaan 1, [Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>9713AV   Groningen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL80ABNA0446049352</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Rijksuniversiteit Groningen</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	A, Deusinglaan 1, [Redacted]	Postbus		Postcode en plaats	9713AV   Groningen	IBAN	NL80ABNA0446049352	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen					
Straat en huisnummer	A, Deusinglaan 1, [Redacted]																
Postbus																	
Postcode en plaats	9713AV   Groningen																
IBAN	NL80ABNA0446049352																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 1 5 _ 0 4 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 1 5 _ 0 4 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |   |
|---|
| Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RuG                             |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl                |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging  
 Beschrijving dierproeven (4)


## 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:

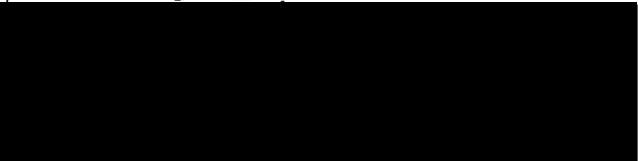
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 Groningen

Datum 21 - 03 - 2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

#### AANLEIDING

The incidence of so-called non-communicable diseases, such as diabetes and the metabolic syndrome (MetS) is rapidly increasing, both in developed and in developing countries. MetS is a clustering of several of the following medical conditions: abdominal (central) obesity, elevated blood pressure, elevated fasting plasma glucose, high serum triglycerides, and low high-density lipoprotein levels. MetS is a major cause of morbidity and mortality by increasing the risk to develop cardiovascular disease (including myocardial infarction, atherosclerosis, cerebrovascular accidents) and type 2 diabetes. (reviewed by S Motillo *et al*, *J Am Coll Cardiol*. 2010). Current therapeutic strategies for MetS have only limited effectiveness. It has increasingly been recognized that preventive strategies may ultimately become more effective than curative strategies aimed at already established consequences. To identify targets of prevention, insights into the development and pathophysiology of MetS are essential. The pre- and early postnatal phase of human life has already been identified as an important period in which environmental exposures can determine the risks for the development of MetS in later life. A clear example has been the epidemiological studies in humans who had been exposed during their fetal life to the Dutch famine ('Hongerwinter', 1944-1945) and subsequently had strongly increased prevalence of MetS at middle age. This phenomenon has led to the concept of "metabolic programming", i.e. the exposure to environmental factors in early life shape the lifetime risks to develop (risk factors of) MetS in adult life. A scientific definition of programming is: the induction, deletion, or impaired development of a somatic structure or "setting" of a physiological system by an early life stimulus operated at a "critical" or "sensitive" period during development (Kiani, Nielsen 2011 *Endocrinology Metabolism*).

#### ACHTERGROND

One major environmental factor in early life is the amount and type of feeding that an infant receives. Epidemiologically, the beneficial influences of breastfeeding, compared with infant formula, on long term development has repeatedly been demonstrated, including the prevalence of obesity and hypercholesterolemia at adult life. These data strongly support the relevance of early nutrition and the preventive potency with respect to long-term health and disease. Ethical considerations regarding studies in young infants and the extended time (up to 6 decades) needed to characterize the phenotype of MetS, have led [redacted] to search for relevant model systems to unravel its development and pathophysiology and to characterize targets of prevention.

[redacted] t has remained unclear, however, which specific element of the [redacted] is essential for the observed effects and how the programming effects are mediated. Insights in these elements are expected to allow for more targeted manipulation and for the identification of (surrogate) biomarkers of programming efficacy, which will be helpful to allow later extension of key studies to the human situation.

#### VOORGAAND ONDERZOEK

[REDACTED] The digestion and absorption of dietary fats is composed of a whole machinery, aimed to break down the hydrophobic triglycerides towards the level of free fatty acids and monoglycerides, transport them through the aqueous milieu of the intestinal lumen towards the epithelium, translocate them across the apical membrane of the enterocytes and then re-assemble them into triglycerides and finally excrete them in the form of chylomicrons. This complex process is needed to accommodate the transport of the hydrophobic fats across the aqueous phase of the intestinal lumen, the hydrophobic membranes of the enterocytes and the aqueous phase of the blood compartment. A multitude of enzymes, transporters and cofactors are involved in the absorption process, including lipases and bile acids (BA). [REDACTED]

[REDACTED] whereby rats were used for procedures which are impossible to perform in mice (such as large blood volume collection and duodenal cannulation).

We aim to address the mechanism [REDACTED] metabolic programming [REDACTED]

#### **Animal models**

The following models will be utilized within this proposed project:

**Mouse model for metabolic programming:** C57Bl/6j mice will consume a specific 'programming' diet during early-life or during (early) adulthood. [REDACTED]

**Rat model for metabolic programming:** Wistar rats will consume a specific 'programming' diet during early-life or during (early) adulthood. Metabolic programming is assessed at adult life by determining the risks to develop features of MetS upon exposure to environmental challenges. The rat model is unique in that it allows for certain procedures which are impossible in mice. The mouse model is not suitable to analyze all processes in intestinal fat absorption and in postprandial metabolism, for example by limitations in possibilities to permanently catheterize veins and the enterohepatic circulation (bile duct, duodenum). As developed and validated by ourselves, the rat model with permanent catheterization uniquely allows to dissect for example gastric emptying from impaired intestinal lipolysis and intraluminal lipolysis from postlipolytic absorption of free fatty acids (Minich et al, 1999, Kalvianakis et al., 1999, Nishioka et al., 2004), The rat model (Wistar) allows for repeated fat absorption studies with repeated blood sampling under un-anaesthetized conditions. Rats are also needed as model for detailed investigations on postprandial metabolism because of the volumes of blood (in total up to 1 ml), which cannot be obtained from mice.

**Genetically modified mouse models, to be subjected to metabolic programming strategies.** Based on the studies on [REDACTED] it could be that key factors are revealed which are essential or mediating the mechanism of metabolic programming. Examples for such key factors could be genes/proteins demonstrated to essential [REDACTED] If the studies in wild type mice provide strong indications for specific key regulatory genes/proteins, their involvement in metabolic programming will be determined by imposing a metabolic programming strategy on mice in which these genes are genetically inactivated (whole body or tissue specific) and assessing if or to what extent metabolic programming is prevented. Candidate genes that may be involved include [REDACTED]

Application of these models will depend on results in wild type mice and rats by us and other work published in the meantime (See Go/No-Go criteria later on in this document).

Relevant literature:

#### **Metabolic syndrome**

Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(14): 1113-32.

#### **Metabolic programming (in early-life):**

Lawlor, D. A., C. J. Riddoch, et al. (2005). "Infant feeding and components of the metabolic syndrome: findings from the European Youth Heart Study." *Archives of Disease in Childhood* **90**(6): 582-588.

Lucas, A. (2005). "Long-Term Programming Effects of Early Nutrition [mdash] Implications for the Preterm Infant." *J Perinatol* **25**(S2): S2-S6.

Srinivasan, M., S. G. Laychock, et al. (2003). "Neonatal Nutrition: Metabolic Programming of Pancreatic Islets and Obesity." *Experimental Biology and Medicine* **228**(1): 15-23.

Fernandez-Twinn, D. S. and S. E. Ozanne (2010). "Early life nutrition and metabolic programming." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1212**(1): 78-96.

Calkins, K. and S. U. Devaskar (2011). "Fetal Origins of Adult Disease." *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* **41**(6): 158-176.

Dyer, J. S. and C. R. Rosenfeld (2011). "Metabolic imprinting by prenatal, perinatal, and postnatal overnutrition: a review." *Seminars in reproductive medicine* **29**(3): 266-276.

#### **Breastfeeding:**

Monterrosa, E. C., E. A. Frongillo, et al. (2008). "Predominant Breast-Feeding from Birth to Six Months Is Associated with Fewer Gastrointestinal Infections and Increased Risk for Iron Deficiency among Infants." *The Journal of Nutrition* **138**(8): 1499-1504.

Control, C. f. D. and Prevention (2013). "Progress in increasing breastfeeding and reducing racial/ethnic differences-United States, 2000-2008 births." *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **62**(5): 77.

Durmuş, B., D. H. M. Heppel, et al. (2014). "General and abdominal fat outcomes in school-age children associated with infant breastfeeding patterns." *The American Journal of Clinical Nutrition* **99**(6): 1351-1358.

Wolf, J. H. (2003). "Low Breastfeeding Rates and Public Health in the United States." *American Journal of Public Health* **93**(12): 2000-2010.

Owen, C. G., R. M. Martin, et al. (2006). "Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence." *The American Journal of Clinical Nutrition* **84**(5): 1043-1054.

#### **Digestion characteristics:**

Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *The EMBO Journal*. 2006;25(7):1419-25.

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological reviews*. 2009;89(1):147-91.

#### **Rat techniques**



[REDACTED]

**Statistics**

Lenth RV. Some Practical Guidelines for Effective Sample Size Determination. The American Statistician. 2001;55(3):187-93.

**3.2 Doel**

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

We aim to elucidate the mechanism(s) [REDACTED]  
[REDACTED] metabolic programming. The proposed project specifically aims to address the [REDACTED]  
[REDACTED]

The sub-goals will be performed sequentially (meaning one-by-one) with clear Go/No-Go criteria. The sub-goals are:

[REDACTED]

[REDACTED]

**Haalbaarheid:**

Within our research group, department and network of collaborators there is sufficient knowledge, skill and experience present to successfully test our hypotheses and to conclusively address our research questions. This proposed project is part of an ongoing investigation [REDACTED]  
[REDACTED] The different elements in this proposal will be performed sequentially (meaning one-by-one) with clear Go/No-Go criteria as detailed below. [REDACTED]

[REDACTED] The workload can be evenly spread across the multiple researchers and technicians that will work on this project. The workload is realistic for the requested timespan.

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

In 2008, the World Health Organization (WHO) estimated that globally 800 million people are classified 'overweight', whereas 500 million classified 'obese'. Obesity is the biggest risk factor for developing MetS. Obesity is not exclusive to industrialized nations. Current predictions indicate that up to 57% of the entire world population will be classified 'overweight' by the year 2030. Current strategies for reducing body weight in overweight individuals are not adequate. In sharp contrast, preventing obesity in children is particularly effective for reducing obesity and MetS in adulthood. Programming is a realistic method of preventing obesity and its effects on health. Programming has evolved over decades from a theoretical explanation for adverse health effects seen in adults that were exposed to the Dutch Famine of 1944-45 to nowadays a practical approach for preventing adulthood diseases. It is in global interest that we explore the opportunities and mechanisms of nutritional programming; to improve human health and promote healthy ageing. The proposed project is an important part of a large international research endeavour with the primary goal of optimizing early life nutrition with long-lasting positive health effects. The international collaborative effort focusses on improving the long term body composition and metabolic health of infants and young children. Within this research, there is a multitude of scientific and preventive health care opportunities to improve adult health. [REDACTED]

The scientific and societal significance of this research has been thoroughly reviewed and evaluated by international reviewers during grant applications. The proposed research is funded by grants from [REDACTED]

### 3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Our research aims to understand the underlying mechanisms of nutritional programming [REDACTED]

[REDACTED] In general terms, we will start our investigation by globally characterizing nutrition-induced changes in metabolic parameters. If a link between a metabolic parameter [REDACTED] and programming is found in the global studies, we will in-depth investigate this parameter [REDACTED]

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Research strategy.

To attain the goals described in paragraph 3.2, we will perform one-by-one the following studies. The different studies are strongly related to one another, are suitable for answering the main research question and all aid in attaining the research goal. The order in which the experiments will be executed is sequential; meaning experiments are done one-by-one, separated by Go/No-Go criteria.

1. [REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

All experiments described in this proposal will be executed in sequential (phased) fashion; meaning they are done one-by-one with clear Go/No-Go criteria. We will foremost determine globally [Redacted] Only if there are clear indication that these sub-processes are identified [Redacted] we will commence an in-depth investigation into this [Redacted]

Mijlpalen

[Redacted]

Keuzemomenten (go/no-go)

**General:**

Within the proposed research project, all running animal experiments will be evaluated at least quarterly. Herein, we will formulate clear and decisive Go / No-Go moments. Technical problems and delays in the scientific progression of an animal study will be discussed with the relevant authorities as soon as possible. Studies will only be performed if there are scientific reasons to do so.

**Choice of male/female:** [Redacted]

[REDACTED]

**Research methods:** The research method and protocols have already been validated and are currently operational in our lab. We do not expect any delays in the progression of the scientific research. We do not have to validate nor optimize any research methods, [REDACTED]

[REDACTED] An important Go / No-Go decisive point is the presence/absence of differences [REDACTED] If the study would not yield a clear association with the programming effect, we will halt investigation into that particular sub-process. An additional Go / No-Go decisive point would be disproportional animal suffering from an unexpected side-effect of an intervention. However, as said, this is not expected to occur.

[REDACTED] In-depth investigation will only take place if the investigations under 1. yields clear differences [REDACTED] (go/no-go). Each sub-process will only be investigated if there are indications to do so from the global (nr 1.) study. [REDACTED] An additional Go / No-Go decisive point will be the disproportional animal suffering from an unexpected side-effect of an intervention.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Digestion, absorption and bile acids"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Describe the choice of the experimental strategy:

With this project, we aim to determine the underlying mechanism of nutrition-induced programming [redacted]. It has remained unclear how the programming effects are mediated. [redacted]



be investigated in-depth in sub-goal 2.

In addition, a series of non-invasive measurements will be performed, to get insight into physiological processes that require an interplay between multiple organs in the body,

Lenth RV. Some Practical Guidelines for Effective Sample Size Determination. The American Statistician. 2001;55(3):187-93.

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

The experimental designs described below have been categorized into the two sub-goals as described in the main document; ". As per the design of this study, the research is done by strictly following the go/no-go principle of foremost determining the contribution of sub-processes. Only if sub-goal 1 reveals clues that are indicative of the potential mechanism, we will commence the in-depth investigation on that particular sub-process as described in sub-goal 2.

Experiments are based on the framework described in "Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak". We strive to implement the three Rs as much as possible by utilizing modern measurement techniques, pain-killers and anesthesia where appropriate, statistical methods backed up by (published) results and our vast experience in performing metabolic experiments. Go/no-go criteria described in the main document will be extensively used. In addition, we will reuse male breeders whenever possible.

1) Sub-goal 1: **To determine whether eIMF affects fat absorption and postprandial fat metabolism after non-programming (acute) or programming**

More specifically, non-programming cohorts are performed in adult animals, whereby programming cohorts are started in pups and the animals are followed up into adulthood.

In the experimental designs described below,



extra care is given to the three Rs, and the modularity of the study design allows for clear and concise Go/no-go criteria.

Sub-goal 1 is the inventarisation (also known as characterizing) part of our proposed research. Due to the complexity of the sub-processes, simultaneous investigation is not possible within one cohort. Sub-processes are investigated separately. If certain sub-processes do not affect measured parameters after a programming diet is administered, we are able to reject the hypothesis that those sub-processes are causally linked to the programming effect. These rejected sub-processes will thus not be investigated in sub-goal 2. This clear and concise go/no-go procedure will reduce the total number of animals necessary to investigate the programming effect of eIMF.

**1. a.**

and food collection during part of the experiment over multiple days, body weight max 3x per week, body composition max 1x per 2 weeks.

**1. b.**

[Redacted text block]

1. c. [Redacted text block]

1. d. [Redacted text block]

2) Sub-goal 2: **If one (or more) sub-process(es) can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined.**

[Redacted]

The experimental designs described below will only be performed IF (go/no-go) the experiments of sub-goal 1 provide incentive for in-depth investigation.

**2. a.** [Redacted]

**2. b.** [Redacted]

[Redacted text block]

2. c.

[Redacted text block]

2. d.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

2. e. [Redacted text block]

2. f. [Redacted text block]

[Redacted text block]

2. g. [Redacted text block]

---

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). Of course, the extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group and per cohort as much as possible. [Redacted text]. Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature. [Redacted text]. [Redacted text]. Male breeders will be re-used within and between our experiments and by other researchers whenever possible to reduce the total number of animals.

---

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: Mice: [redacted]

Rats: [redacted]

The mouse

and rat studies are not repeats of one another, as the rat studies generate data which the mouse studies cannot.

Herkomst: The animals will originate from our breeding facility, from our collaborators or from commercial sources.

Levensstadia: For experiments that involve breeding; male and female mice or rats of reproductive age are used. [redacted]

Geschatte aantallen:

The numbers displayed below were calculated based on group size calculations shown in "Beschrijf de beoogde behandeling".

Sub-goal 1) [redacted]

- 1. a. [redacted] 120 mice, "licht" discomfort
- 1. b. [redacted] 440 mice, "licht" discomfort
- 1. c. [redacted] 400 mice, "licht" discomfort
- 1. d. [redacted] 520 mice, "licht" discomfort

Sum: 1480 mice with "licht" discomfort.

Sub-goal 2) If sub-processes can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined.

- 2. a. [redacted] 880 mice, "licht" discomfort
- 2. b. [redacted] 440 mice, "matig" discomfort
- 2. c. [redacted] 300 rats, "matig" discomfort
- 2. d. [redacted] 880 mice, "licht" discomfort
- 2. e. [redacted] 880 mice, "licht" discomfort
- 2. f. [redacted] 1040 mice, "licht" discomfort
- 2. g. [redacted] 1040 mice, "matig" discomfort

Sum: 3680 mice with "licht" discomfort, 1480 mice with "matig" discomfort and 300 rats with "matig" discomfort. A total of 5460 animals.

In total, these numbers account for 5160 mice with "licht" discomfort, 1480 mice with "matig" discomfort and 300 rats with "matig" discomfort. This sums up

to 6940 animals, of which 74% experience "licht" discomfort and 26% experience "matig" discomfort.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Male breeders can be used repetitively to generate offspring for multiple experiments. Male breeders that are no longer used for reproductive purposes can be offered for re-use to other researchers or for educational purposes. [REDACTED] Male and female animals of reproductive age and appropriate genetic background from other experiments that have not been subjected to any treatment can potentially serve as breeders for our experiments. [REDACTED]

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Verfijning: Experiments are designed in such a way to minimize stress and discomfort. Anesthesia and painkilling will be employed whenever appropriate. In case anesthesia is not absolutely necessary, alternative approaches will be used, [REDACTED] Experiments will be executed by highly trained and experienced researchers and technicians to further reduce stress and discomfort to the animals. Personnel will be trained by experts to avoid causing stress and discomfort to the animals as much as possible.

Vervanging: The MetS is a systemic disorder that involves inter-organ interactions. At this moment, research into MetS cannot be done with in vitro techniques (using cell culturing) nor with ex vivo (using organs or tissues outside the body). Research into MetS requires the use of intact organisms. Moreover, metabolic programming is an interplay between multiple tissues and organs in the body and it requires an intact organism to fully appreciate and measure the changes to (metabolic) health. Altogether, the proposed studies do not yet allow for alternative approaches for animal experimentation. [REDACTED]

Vermindering: This animal research proposal has been written from start to finish with the "Go/No-Go" principle in mind. All aspects of the proposed study are scrutinously designed to be both modular and linear, to allow for sequential (one-by-one) execution of the sub-goals. The application of Go/No-Go will significantly reduce the total number of animals used in this proposed work. [REDACTED] We will



combine measurement techniques in cohorts whenever practically possible and if the cumulative discomfort does not change. We perform group size analyses using historical data available in our laboratory to define the minimal amount of animals required for these studies. [REDACTED]

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Animals will be handled and monitored on a regular basis to reduce the stress and fear of handling and to identify potential discomfort or adverse health effects as early as possible. All involved personnel is highly experienced in handling animals or has the opportunity to be taught by an expert. For experiments requiring invasive manipulation, anesthesia and/or painkilling will be applied. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately according to local law and regulations.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

We have performed thorough analysis of existing literature and continue to monitor newly published work in this field of research. We will only perform experiments that have not been performed (correctly) as such according to the literature.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

The rule of thumb is that animals are to be group housed. Unless there are clear scientific reasons, we will always group-house animals. For certain procedures animals need be housed individually or in standardized numbers. [REDACTED]

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress, discomfort and fasting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individual housing, [REDACTED] may cause stress/discomfort.

Treatment may induce unexpected stress and/or discomfort, this is however very unlikely. Fasting may cause stress/discomfort, however we do not remove drinking water to lighten the degree of stress and/or discomfort.

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

We will monitor the animals regularly. Treatments, interventions or whole experiments can be discontinued if unacceptable stress or discomfort is observed.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In case animals exhibit abnormal behavior (e.g. inactivity, excessive stress signals) , abnormal posture (ruffled fur, hunched back) or excessive weight loss (>15%) they will be terminated to prevent further discomfort. [REDACTED]

[REDACTED], we do not expect a high degree of drop-out as a result of invasive procedures.

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

Animals which will only undergo "licht" discomfort (74% of total) are not likely to fulfil the abovementioned criteria. Animals with a maximum level of discomfort of "matig" (26%) have a <5% chance to fulfil the abovementioned criteria. [REDACTED]

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

See "A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters" and "B. De dieren" for additional details on the calculations and levels of discomfort.

Sub-goal 1)

- 1. a. 120 mice, "licht" discomfort
- 1. a. 440 mice, "licht" discomfort
- 1. b. 400 mice, "licht" discomfort
- 1. c. 520 mice, "licht" discomfort

Sum: 1480 mice with "licht" discomfort.

Sub-goal 2) If sub-processes can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined

- 2. a. 880 mice, "licht" discomfort
- 2. b. 440 mice, "matig" discomfort
- 2. c. 300 rats, "matig" discomfort
- 2. d. 880 mice, "licht" discomfort
- 2. e. 880 mice, "licht" discomfort
- 2. f. 1040 mice, "licht" discomfort
- 2. g. 1040 mice, "matig" discomfort

Sum: 3680 mice with "licht" discomfort, 1480 mice with "matig" discomfort and 300 rats with "matig" discomfort. A total of 5460 animals.

In total, these numbers account for 5160 mice with "licht" discomfort, 1480 mice with "matig" discomfort and 300 rats with "matig" discomfort. This sums up to 6940 animals, of which 74% experience "licht" discomfort and 26% experience "matig" discomfort. Experiments are always designed in such a way to keep the cumulative discomfort to an absolute minimum.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Male and female breeders that can no longer be used for reproductive purposes will be offered for reuse to other researchers or for educational purposes.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

De flowchart hieronder weergegeven geeft de outline van het voorgestelde project. Sub-doel 1 is een karakteriserende fase waarin zal worden bepaald [REDACTED]

[REDACTED] Sub-doel 2 beschrijft de vervolgstappen indien verschillen [REDACTED] worden gevonden bij sub-doel 1, namelijk de karakterisering in hoeverre een of meerdere subprocessen essentieel zijn in de programmering.

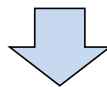
Het bepalen van het mechanisme waardoor voeding in het vroege leven een lange-termijn metabole programmering veroorzaakt.

De dierproeven beschreven in dit werkprogramma hebben tot doel om het mechanisme van programmering te bepalen [REDACTED]. Door op moleculair niveau inzicht te verkrijgen in het (de) subproces(sen) betrokken bij metabole programmering kan zuigelingenvoeding geoptimaliseerd worden [REDACTED]

Het doel van deze aanpak is uiteindelijk door zo gericht mogelijke aanpak lange termijn gezondheid te optimaliseren door het verminderen van de risico's op het zogenaamde metabole syndroom.

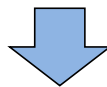
### Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het [REDACTED]

[REDACTED]



Sub-doel 1)

[REDACTED]



GO / NO-GO

Sub-doel 2)

Indien verschillen in subprocessen [REDACTED] karakterisering in hoeverre het (de) geïdentificeerde subproces(sen) essentieel is (zijn) in de programmering.



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Type 2 diabetes, obesitas, metabool syndroom, epigenetica, metabool programmeren

## 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Overgewicht (obesitas) en suikerziekte (Type 2 diabetes) vormen een steeds groter medisch en sociaal-economisch probleem. Overmatige voedselinname en een tekort aan lichaamsbeweging, kenmerkend voor de Westerse samenleving, spelen hierin een grote rol. Obesitas en diabetes, samen met hart- en vaatziekten en bepaalde vormen van kanker (darm-, prostaat en borstkanker) zijn onderdeel van het "metabool syndroom", en worden allen gekenmerkt door een onbalans in de vet- en suikerstofwisseling. Bij type 2 diabetes spelen enerzijds insuline resistentie en anderzijds verminderde insuline afgifte een rol. Insuline resistentie kan lang door het lichaam worden gecompenseerd door het verhogen van de insuline productie, maar wanneer dit niet meer voldoende is, leidt dit tot diabetes.
- Gedurende een kritische periode in het leven worden stofwisselingseigenschappen bepaald, die de rest van het leven een belangrijke rol spelen. Dit fenomeen heet 'programmeren' en omvat gebeurtenissen in het vroege leven, die van invloed zijn op (stofwisselings-) eigenschappen in het latere leven. Het is een interessant aangrijpingspunt voor het verbeteren van lange-termijn gezondheid op populatieniveau. Verworven kennis uit ons lab toont aan dat minimale aanpassingen aan de voeding in het vroege leven een groot effect kunnen hebben op de kans op de ontwikkeling van overgewicht en diabetes op latere leeftijd. Antwoord op de vraag "hoe werkt het?" zal ons kunnen helpen om in de toekomst (jonge) kinderen (en volwassenen) de beste kans op een gezond leven te bieden. Wij beogen in dit project het programmerend effect van voeding (vroeg in het leven) op de vet- en suikerstofwisseling later-in-het-leven te verklaren.
- De dierproeven beschreven in dit werkprogramma hebben als doel het mechanisme van programmeren te bestuderen en te ontrafelen. Hierbij maken we onder andere gebruik van muismodellen waarbij specifieke eiwitten betrokken bij het vettransport of -metabolisme uitgeschakeld (knockout) of juist geactiveerd (farmacologische activatie) zijn. Daarnaast maken we gebruik van ratmodellen. Met dit onderzoek willen we op moleculair niveau inzicht verkrijgen in de processen die betrokken zijn bij programmeren. Inzicht in deze processen kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe (medische-) voedingsmiddelen, geneesmiddelen en/of strategieën voor de behandeling dan wel voorkomen van obesitas en type 2 diabetes.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- We verwachten meer inzicht te krijgen in het programmerend proces dat ten grondslag ligt aan de (positieve) lange-termijn invloeden van bepaalde voedingsmiddelen in het vroege leven. Deze belangrijke kennis draagt bij aan de ontwikkeling van voeding en nutritionele interventies voor zowel kwetsbare doelgroepen (zoals baby's). Dit zal uiteindelijk leiden tot een verbetering van preventie en therapie en daarmee tot een vermindering van de sociale en economische belasting van de samenleving.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Binnen dit project maken wij gebruik van muizen en ratten. De maximale aantallen dieren zijn vooraf berekend middels een gevalideerde statistische methode. Het project is onderverdeeld in twee sub-doelen. De berekende aantallen zijn als volgt:

Sub-doel 1) Bepaal het effect van een programmerende voeding op de vet-opname en het vet-metabolisme na kortstondig (niet-programmerend) of langdurig (programmerend) gebruik:

- 1. a. Acute effecten: 120 muizen, licht ongerief
- 1. a. Basale opname karakterisatie: 440 muizen, licht ongerief
- 1. b. Metabolische parameters: 400 muizen, licht ongerief
- 1. e. Galzout karakterisatie: 520 muizen, licht ongerief

Tezamen: 1480 muizen met licht ongerief.

Sub-doel 2) Als sub-processen kunnen worden geïdentificeerd (in sub-doel 1), zal de rol van deze processen in programmeren worden onderzocht:

- 2. a. Programmeren in een genetisch model: 880 muizen, licht ongerief
- 2. b. Glucose en vet parameters: 440 muizen, matig ongerief
- 2. c. Absorptie in de twaalfvingerige darm: 300 ratten, matig ongerief
- 2. d. Vet-opname parameters: 880 muizen, licht ongerief
- 2. e. Vet-klaring parameters: 880 muizen, licht discomfort
- 2. f. Cholesterol metabolisme: 1040 muizen, licht ongerief
- 2. g. Galzout metabolisme: 1040 muizen, matig ongerief

Tezamen: 3680 muizen met licht ongerief, 1480 muizen met matig ongerief, 300 ratten met “matig” ongerief. In totaal 5460 dieren.

Indien alle aspecten van beide subdoelen uitgevoerd worden (zie go/no-go criteria) omvat dit project een maximum van 5160 muizen met licht ongerief, 1480 muizen met matig ongerief en 300 ratten met matig ongerief. Tezamen gaat het om 6940 dieren, waarvan 74% licht ongerief zullen ervaren en 26% matig ongerief zullen ervaren. Door het gebruik van uitgebreide go/no-go criteria ligt het realistische aantal dieren lager.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Licht ongerief: fokken, individuele huisvesting voor een beperkt aantal handelingen, beperkt aantal toedieningen, beperkt aantal non-invasieve metingen, kleine operatie, beperkte bloedafname. Deze handelingen dragen voor circa 74% bij.

Matig ongerief: uitvoering van experimenten met matig ongerief, operaties met matig ongerief, operatief aanbrengen van verblijfscanule, infusie met herhaalde bloedafname, huisvesting in kooi met bewegingsbeperking. Deze handelingen dragen voor 26% bij.

Binnen dit onderzoeksprogramma wordt gewerkt met diermodellen die gevoelig zijn voor overgewicht, insuline resistentie en type 2 diabetes. De muizen zullen o.a genmutaties dragen die ook bij de mens voorkomen. Omdat het genoom van de mens en de muis in hoge mate vergelijkbaar zijn, zijn ook de gevolgen van de modificaties goed vergelijkbaar. Over het algemeen zullen de



dieren gezond zijn en zal een speciaal dieet en/of een stressfactor nodig zijn om de ziekteverschijnselen op te wekken. De diëten worden goed geaccepteerd door de dieren. De combinatie erfelijkheidsfactoren en dieet *an sich* veroorzaakt in de regel geen lijden. Het is echter mogelijk dat het effect van het transgen tevoren niet goed wordt ingeschat, omdat de effecten alleen kunnen worden beredeneerd op grond van verwachte genfunctie.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Licht ongerief: 74%  
Matig ongerief: 26%

Zie het kader 3.3 en 3.4 ' Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?' voor nadere toelichting van de verdeling van de verwachte ernst, de exacte berekende aantallen en het daaropvolgende percentage.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Dood in het kader van de proef. De dieren worden op humane wijze geëuthanaseerd. De organen en weefsels zullen uit het karkas worden gehaald, waarna de monsters uitgebreid geanalyseerd worden.

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Het is (nog) niet mogelijk om het verloop van obesitas en diabetes uitsluitend *in vitro* (d.w.z. in weefsel buiten het lichaam) of *ex vivo* (d.w.z. in organen buiten het lichaam) te bestuderen. Obesitas is een complex ziektebeeld, waarbij verschillende metabole processen en omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen. Ook voor veel aspecten van diabetes, het metabool syndroom en metabool programmeren geldt dat de betrokken processen op dit moment nog niet te onderzoeken zijn zonder een intacte interactie tussen verschillende organen en weefsels. Tegenwoordig beschikken we over muis- en ratmodellen die gevoelig zijn voor het ontwikkelen van o.a. obesitas, type 2 diabetes en gerelateerde metabole ziekten. Deze diersmodellen zijn doorgaands uiterst geschikt voor onderzoek naar programmeren, en maken het mogelijk om een stap verder te gaan om de rol van voeding en omgevingsfactoren bij programmeren gedetailleerd te kunnen begrijpen.

Proefdiervrije alternatieven bestaan op dit moment nog niet voor het voorgestelde onderzoek, omdat het hele organisme in zijn normale fysiologische context betrokken is en bestudeerd moet worden. Geïsoleerde cellen of organen voldoen hier niet aan. Ook (niet-zoog-)dieren met een eenvoudiger bouwplan dan de muis of rat zijn ongeschikt, omdat fysiologische regelprocessen te veel afwijken van die van de mens, waardoor de resultaten onvoldoende te vertalen zijn naar de mens.

[

#### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Bepaalde eigenschappen van voeding worden onderzocht in ons lab zonder proefdieren. Daar waar biologische (deel)processen in celkweek (zonder dieren of weefsels buiten het lichaam) kunnen worden bestudeerd, zal dat ook gedaan worden. Genetisch gemodificeerde dieren kunnen overigens ook een belangrijke bijdrage leveren aan dergelijke celkweekstudies, omdat van deze dieren cellen kunnen worden afgeleid die het bestuderen van bepaalde biologische processen mogelijk maken.

Statische berekeningen (o.m. groeps-grootte analyse) worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Uiteraard wordt de uitgebreide ervaring, die reeds binnen ons laboratorium is opgedaan, meegenomen bij deze berekeningen. Experimenten worden altijd gefaseerd en in wetenschappelijk-onderbouwde volgorde uitgevoerd, met hierin duidelijk geformuleerde Go/No-Go criteria, zodat er geen niet-noodzakelijke proeven worden uitgevoerd. Daarnaast wordt er in dit voorgestelde onderzoek veelvuldig gebruik gemaakt van niet-invasieve metingen met een laag ongerief, waardoor herhaalde metingen gedaan worden aan hetzelfde dier. Meerdere metingen in hetzelfde dier verminderen het totaal benodigde aantal dieren substantieel. Een voorbeeld van een non-invasieve meting is de analyse van lichaamscompositie d.m.v. röntgenstraling of MRI, in tegenstelling tot het chemisch analyseren van het karkas na opoffering. Door het veelvuldig toepassen van niet-invasieve methodieken kunnen we de voortgang van het ziektebeeld beter in kaart brengen en hoeven er dus op minder tijdstippen dieren te worden opgeofferd.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Binnen dit voorgestelde project zullen bepaalde methodieken zoals galcanulatie terminaal (en onder verdoving) worden uitgevoerd in plaats van met een verblijfscanule. Het dier zal hierdoor niks voelen van de meting. Dit levert een substantiële verfijning op ten opzichte van onderzoek die gebruik maakt van een verblijfscanule voor het meten van galvorming (waarbij het dier wakker is). Metingen die niet terminaal uitgevoerd worden, worden indien mogelijk gedaan m.b.v. niet-invasieve methoden met een laag niveau ongerief. De proeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in muizen en ratten, en de experimentele opzet is erop gericht om ongerief en stress tot een minimum te beperken. Tijdens operaties en pijnlijke procedures zullen te allen tijde pijnstilling en anesthesie toegepast worden. De uitgebreide ervaring van onze technici leveren substantiële verfijning door het minimaliseren van ongerief tijdens en na operaties. De kennis en expertise opgebouwd uit het onderzoek naar deze zoogdieren is groot, waardoor er zeer ruime ervaring aanwezig is die toegepast wordt om ongerief zo veel mogelijk te voorkomen bij alle handelingen. De handelingen noodzakelijk voor dit onderzoek zullen uitsluitend uitgevoerd worden door competente en zeer ervaren technici en onderzoekers. Wij kiezen binnen dit onderzoek voor de muis en rat ter verfijning van het onderzoek, omdat uit uitgebreide data is gebleken dat muizen en ratten uitermate geschikt zijn om biologische processen, die ook plaatsvinden bij de mens, in een compleet organisme te bestuderen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve

Niet-invasieve metingen worden gedaan om het ontwikkelende ziektebeeld tijdig te identificeren. Hierdoor kunnen dieren tijdig worden opgeofferd om onnodig lijden te minimaliseren. Goede monitoring zal bovendien helpen te voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongeriefniveau wordt overschreden. Adequaat gebruik van anesthesie wordt toegepast, waardoor ongerief bij

[

(schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

metingen zo veel mogelijk voorkomen wordt. Daarnaast wordt aandacht gegeven aan een spoedig herstel na operaties d.m.v. extra warmte en zacht voer. Het welzijn van de dieren wordt geregistreerd.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

# Format DEC-advies

---

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

## A. Algemene gegevens over de procedure



1. Aanvraagnummer: (Interne RUG code **8036**)
2. Titel van het project: **Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven.**
3. Titel van de NTS: **Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
  - mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **05-11-2015**
  - aanvraag compleet: **05-11-2015**
  - in vergadering besproken: **13-11-2015**
  - anderszins behandeld: **18-12-2015, 02-03-2016, 16-03-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot **16-11-2015 tot 08-12-2015, 18-12-2015 tot 26-02-2016, 02-03-2016 tot 15-03-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **08-12-2015, 26-02-2016, 15-03-2016**
  - advies aan CCD: **17-03-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-11-2015, 18-12-2015, 02-03-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:
- Er zijn algemene vragen gesteld over de focus van het project en verduidelijkingen gevraagd over verbanden tussen onderzoeksdoelen en te onderzoeken parameters, onderbouwing van te gebruiken diersoorten/modellen en aantallen.

- Meer specifieke vragen waren:

- In de projectaanvraag wordt gemeld dat   

- In de projectaanvraag wordt nergens acuut noch chronisch gedefinieerd.
- Over de maximale levensduur van de mannelijke dieren wordt 1 jaar gemeld. Hoe lang duurt een subproef eigenlijk per dier oftewel wat is de levensduur van een dier per subbijlage en hoeveel herhalingen van de diverse metingen zijn maximaal voorzien per dier?

- 
- NB De zin uit de NTS: "Metingen die niet terminaal uitgevoerd worden, worden zo vaak mogelijk gedaan m.b.v. niet-invasieve methoden met een laag ongerief." kan verwarring geven ten aanzien van zo vaak mogelijk.

- Datum antwoord:
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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

- Datum expert advies
- Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **ja, het betreft immers een door de CCD goedgekeurde DEC**.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **nvt**.

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

1. Het project is:
  - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **nvt**.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **ja**.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **De aard van het onderzoek vooronderstelt een intact dier teneinde interacties in het kader van de stofwisseling**

**genoegzaam in beeld te krijgen. Indien opportuun zal gebruik worden gemaakt van *in vitro* onderzoek in het betreffende project.**

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **De vereiste vermindering wordt vooral beoogd door herhaalde metingen met gering ongerief aan eenzelfde dier uit te voeren.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Verfijning wordt in het projectvoorstel zoveel als mogelijk nagestreefd, zoals ondermeer wordt geïllustreerd** [REDACTED]  
[REDACTED]

10. D  
e niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. **Ja**

## **D. Ethische afweging**

**De prevalentie van stofwisselingsziekten als suikerziekte en het metabool syndroom neemt in rap tempo toe. Ten aanzien van het metabool syndroom zijn vooral de complicaties gevreesd, zoals daar zijn een hartinfarct, arteriosclerose en een hersenbloeding. De therapie van het metabool syndroom is hachelijk en de aanpak ervan moet veeleer in de preventie worden gezocht. Het blijkt dat de condities in de foetale fase zeer van belang zijn bij de ontwikkeling van metabool syndroom op latere leeftijd,** [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

█ wordt getracht het mechanisme van “programmering der stofwisseling” te ontrafelen met het oog op preventieve interventies.

Gezien het heldere stappenplan alsmede goed gedefinieerde go/no go momenten is het projectvoorstel samenhangend en zijn fases onderling afhankelijk, waardoor het projectvoorstel is verworpen tot een fraaie toetsbare eenheid.

De doeleinden van het project rechtvaardigen naar de mening van de DEC het voorgestelde gebruik van dieren, met de daarbij toegebrachte schade in de vorm van lijden, pijn en angst (bij 26% van dit aantal dieren ingeschat als matig). Dit teneer omdat het onderzoek uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is en het waarschijnlijk is dat de doeleinden worden gehaald, waardoor op termijn de mogelijkheden tot preventie van het metabool syndroom bij patiënten mogelijk worden vergroot. Dit is zowel een individueel belang voor betrokkenen als een breder maatschappelijk belang.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016484

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016484. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 15 april 2016  
Geplande einddatum: 15 april 2021  
Titel project: Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven  
Titel niet-technische samenvatting: Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven  
Naam DEC: DEC-RuG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016484

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700484

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016484	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[Redacted]

[Redacted]

A. Deusinglaan 1, [Redacted]  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016484

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 1 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven met aanvraagnummer AVD 105002016484. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Kunt u een toelichting geven op de haalbaarheid van uw project binnen de door u aangevraagde termijn van 5 jaar. Dit in relatie tot het bovenstaande waar voor de fase 1a t/m d een termijn van 5 jaar wordt voorzien.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Datum**

1 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002016484

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

-



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |  |
|----------------|--|--|
| Aanvraagnummer |  |  |
|----------------|--|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

In goede orde ontvingen wij uw schrijven van 1 april omtrent nog enige onduidelijkheden over onze aanvraag (AVD105002016484). Hierbij sturen wij u de informatie die u nog nodig heeft. Voor de leesbaarheid hebben wij de door u naar voren gebrachte punten dik gedrukt weergegeven.

[Redacted text block]

Bij herlezen constateren wij inderdaad dat de oorsprong van deze vermenigvuldiging duidelijker kan worden opgeschreven. [Redacted text]

[Redacted text block]

[Redacted text] Wij zullen dus inderdaad meerdere [Redacted text] gaan testen om vast te stellen welke factor(en) verantwoordelijk zijn voor de *programming*.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text] Wij voorzien een tijdsbestek van maximaal 3 jaar voor het behalen van de subdoelen van fase 2. Wij voorzien dat het hoofddoel (dus de samenhang van fase 1 en fase 2) binnen de gestelde 5 jaar uitgevoerd kan worden.

Bij nader inzien betreft het dus jaar 1+2 voor fase 1 en jaar 3+4+5 voor fase 2, met als gevolg reductie in aantal aangevraagde proefdieren, namelijk tot 2/5 (40%) van de beschreven benodigde dieren in fase 1 en 3/5 (60%) van de beschreven benodigde dieren in fase 2. Onze verontschuldigen voor de door ons veroorzaakte onduidelijkheid.

**Kunt u een toelichting geven op de haalbaarheid van uw project binnen de door u aangevraagde termijn van 5 jaar. Dit in relatie tot het bovenstaande waar voor de fase 1a t/m d een termijn van 5 jaar wordt voorzien.**

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] Wij zijn van mening dat het voorgestelde project haalbaar is binnen de aangevraagde termijn van 5 jaar.

Wij hopen u hiermee voldoende duidelijkheid te hebben gegeven en verontschuldigen ons nogmaals voor de ontstane verwarring. Uiteraard zijn wij te allen tijde bereid een en ander nader toe te lichten indien gewenst.

In afwachting van uw reactie,

met vriendelijke groeten,

[Redacted]

[Redacted]



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                       |
|------------|--------------------------------------|
| 1          | Digestion, absorption and bile acids |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Describe the choice of the experimental strategy:

With this project, we aim to determine the underlying mechanism of nutrition-induced programming

It has remained unclear how the programming effects are mediated.



will be determined. In other words, if a sub-process investigated under sub-goal 1 is different and thus may be implicated in metabolic programming, it will be investigated in-depth in sub-goal 2. [REDACTED]

[REDACTED] In addition, a series of non-invasive measurements will be performed, to get insight into physiological processes that require an interplay between multiple organs in the body, [REDACTED]

Lenth RV. Some Practical Guidelines for Effective Sample Size Determination. The American Statistician. 2001;55(3):187-93.

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

The experimental designs described below have been categorized into the two sub-goals as described in the main document; [REDACTED] [REDACTED] As per the design of this study, the research is done by strictly following the go/no-go principle of foremost determining the contribution of sub-processes. Only if sub-goal 1 reveals clues that are indicative of the potential mechanism, we will commence the in-depth investigation on that particular sub-process as described in sub-goal 2.

Experiments are based on the framework described in "Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak". We strive to implement the three Rs as much as possible by utilizing modern measurement techniques, pain-killers and anesthesia where appropriate, statistical methods backed up by (published) results and our vast experience in performing metabolic experiments. Go/no-go criteria described in the main document will be extensively used. In addition, we will reuse male breeders whenever possible.

1) Sub-goal 1: [REDACTED]

[REDACTED] non-programming cohorts are performed in adult animals, whereby programming cohorts are started in pups and the animals are followed up into adulthood. [REDACTED]

[REDACTED] In the experimental designs described below, extra care is given to the three Rs, and the modularity of the study design allows for clear and concise Go/no-go criteria. We expect to spend a maximum of 2 years on the experiments described in sub-goal 1. Due to the complexity of the sub-processes, we expect that within the specified time, we require each cohort to be performed a maximum of 2 times, in order to attain the sub-goal.

Sub-goal 1 is the inventarisation (also known as characterizing) part of our proposed research. Due to the complexity of the sub-processes, simultaneous investigation is not possible within one cohort. Sub-processes are investigated separately. If certain sub-processes do not affect measured parameters after a programming diet is administered, we are able to reject the hypothesis that those sub-processes are causally linked to the programming effect. These rejected sub-processes will thus not be investigated in sub-goal 2. This clear and concise go/no-go procedure will reduce the total number of animals necessary to investigate the programming effect of eIMF.

**1. a.** [REDACTED]

[REDACTED]

**1. b.** [REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

**1. c.** [Redacted text block]

[Redacted text] 2x per cohort, body composition max 1x per 2 weeks, glucose tolerance test maximal 2x per cohort, insulin tolerance test maximal 2x per cohort.

**1. d.** [Redacted text block]

2) Sub-goal 2: **If one (or more) sub-process(es) can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined.**

[Redacted text block]

The experimental designs described below will only be performed IF (go/no-go) the experiments of sub-goal 1 provide incentive for in-depth investigation. We expect to spend a maximum of 3 years on the experiments described in sub-goal 2.

[Redacted text block]

**2. a.** [Redacted text]

[Redacted text block]

**2. b.** [Redacted text]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

**2. c.** [Redacted]

[Redacted text block]

**2. d.** [Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

2. e. [Redacted]

[Redacted text block]

2. f. [Redacted]

[Redacted text block]

[REDACTED]

**2. g.** [REDACTED]

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). Of course, the extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group and per cohort as much as possible. [REDACTED] Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature. [REDACTED] Male breeders will be re-used within and between our experiments and by other researchers whenever possible to reduce the total number of animals.

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: Mice: [REDACTED] Rats: [REDACTED]. [REDACTED] The mouse and rat studies are not repeats of one another, as the rat studies generate data which the mouse studies cannot.

Herkomst: The animals will originate from our breeding facility, from our collaborators or from commercial sources.

Levensstadia: For experiments that involve breeding; male and female mice or rats of reproductive age are used. [REDACTED]

Geschatte aantallen:

The numbers displayed below were calculated based on group size calculations shown in "Beschrijf de beoogde behandeling".

Sub-goal 1) [REDACTED]

- 1. a. [REDACTED] 48 mice, "licht" discomfort
  - 1. b. [REDACTED] 176 mice, "licht" discomfort
  - 1. c. [REDACTED] 160 mice, "licht" discomfort
  - 1. d. [REDACTED] 208 mice, "licht" discomfort
- Sum: 592 mice with "licht" discomfort.

Sub-goal 2) If sub-processes can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined.

- 2. a. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. b. [REDACTED] 264 mice, "matig" discomfort
- 2. c. [REDACTED] 200 rats, "matig" discomfort
- 2. d. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. e. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. f. [REDACTED] 624 mice, "licht" discomfort
- 2. g. [REDACTED] 624 mice, "matig" discomfort

Sum: 2476 mice with "licht" discomfort, 624 mice with "matig" discomfort and 200 rats with "matig" discomfort. A total of 3296 animals.

In total, these numbers account for 3064 mice with "licht" discomfort, 624 mice with "matig" discomfort and 200 rats with "matig" discomfort. This sums up to 3888 animals, of which 79% experience "licht" discomfort and 21% experience "matig" discomfort.

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Male breeders can be used repetitively to generate offspring for multiple experiments. Male breeders that are no longer used for reproductive purposes can be offered for re-use to other researchers or for educational purposes. [REDACTED]  
[REDACTED] Male and female animals of reproductive age and appropriate genetic background from other experiments that have not been subjected to any treatment can potentially serve as breeders for our experiments. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Verfijning: Experiments are designed in such a way to minimize stress and discomfort. Anesthesia and painkilling will be employed whenever appropriate. In case anesthesia is not absolutely necessary, alternative approaches will be used, [REDACTED]  
[REDACTED] Experiments will be executed by highly trained and experienced researchers and technicians to further reduce stress and discomfort to the animals. Personnel will be trained by experts to avoid causing stress and discomfort to the animals as much as possible.

Vervanging: The MetS is a systemic disorder that involves inter-organ interactions. At this moment, research into MetS cannot be done with in vitro techniques (using cell culturing) nor with ex vivo (using organs or tissues outside the body). Research into MetS requires the use of intact organisms. Moreover, metabolic programming is an interplay between multiple tissues and organs in the body and it requires an intact organism to fully appreciate and measure the changes to (metabolic) health. Altogether, the proposed studies do not yet allow for alternative approaches for animal experimentation.  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Vermindering: This animal research proposal has been written from start to finish with the "Go/No-Go" principle in mind. All aspects of the proposed study are scrutinously designed to be both modular and linear, to allow for sequential (one-by-one) execution of the sub-goals. The application of Go/No-Go will significantly reduce the total number of animals used in this proposed work. [REDACTED] We will combine measurement techniques in cohorts whenever practically possible and if the cumulative discomfort does not change. We perform group size analyses using historical data available in our laboratory to define the minimal amount of animals required for these studies. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Animals will be handled and monitored on a regular basis to reduce the stress and fear of handling and to identify potential discomfort or adverse health effects as early as possible. All involved personnel is highly experienced in handling animals or has the opportunity to be taught by an expert. For experiments requiring invasive manipulation, anesthesia and/or painkilling will be applied. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately according to local law and regulations.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

We have performed thorough analysis of existing literature and continue to monitor newly published work in this field of research. We will only perform experiments that have not been performed (correctly) as such according to the literature.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

The rule of thumb is that animals are to be group housed. Unless there are clear scientific reasons, we will always group-house animals. For certain procedures animals need be housed individually or in standardized numbers. [REDACTED]

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

## H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress, discomfort and fasting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individual housing, [REDACTED], may cause stress/discomfort.

Treatment may induce unexpected stress and/or discomfort, this is however very unlikely. Fasting may cause stress/discomfort, however we do not remove drinking water to lighten the degree of stress and/or discomfort.

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

We will monitor the animals regularly. Treatments, interventions or whole experiments can be discontinued if unacceptable stress or discomfort is observed.

## J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In case animals exhibit abnormal behavior (e.g. inactivity, excessive stress signals), abnormal posture (ruffled fur, hunched back) or excessive weight loss (>15%) they will be terminated to prevent further discomfort. [REDACTED]

[REDACTED], we do not expect a high degree of drop-out as a result of invasive procedures.

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

Animals which will only undergo "licht" discomfort (79% of total) are not likely (<1%) to fulfil the abovementioned criteria. Animals with a maximum level of discomfort of "matig" (21%) have a <5% chance to fulfil the abovementioned criteria. [REDACTED]

## K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

See "A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters" and "B. De dieren" for additional details on the calculations and levels of discomfort.

Sub-goal 1) [REDACTED]

- 1. a. [REDACTED] 48 mice, "licht" discomfort
  - 1. a. [REDACTED] 176 mice, "licht" discomfort
  - 1. b. [REDACTED] 160 mice, "licht" discomfort
  - 1. c. [REDACTED] 208 mice, "licht" discomfort
- Sum: 592 mice with "licht" discomfort.

Sub-goal 2) If sub-processes can be identified, the dependency of metabolic programming on (these) sub-process(es) will be determined

- 2. a. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. b. [REDACTED] 264 mice, "matig" discomfort
- 2. c. [REDACTED] 200 rats, "matig" discomfort
- 2. d. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. e. [REDACTED] 528 mice, "licht" discomfort
- 2. f. [REDACTED] 624 mice, "licht" discomfort
- 2. g. [REDACTED] 624 mice, "matig" discomfort

Sum: 2472 mice with "licht" discomfort, 624 mice with "matig" discomfort and 200 rats with "matig" discomfort. A total of 3296 animals.

In total, these numbers account for 3064 mice with "licht" discomfort, 624 mice with "matig" discomfort and 200 rats with "matig" discomfort. This sums up to 3888 animals, of which 79% experience "licht" discomfort and 21% experience "matig" discomfort. Experiments are always designed in such a way to keep the cumulative discomfort to an absolute minimum. [REDACTED]

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Male and female breeders that can no longer be used for reproductive purposes will be offered for reuse to other researchers or for educational purposes.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.



Ja

---



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016484

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven" met aanvraagnummer AVD105002016484. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 april 2016 hebben wij u om aanvullende informatie gevraagd. Op 6 april 2016 heeft u geantwoord op onze vragen, en op 7 april 2016 een aangepaste versie van de bijlage 3.4.4.1 en de Niet Technische Samenvatting ingediend.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). De algemene voorwaarden betreffende artikel 10, lid 1a van de wet worden gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 15 april 2021 hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden.

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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Adres: A. Deusinglaan [REDACTED]  
Postcode en woonplaats: 9713 AV GRONINGEN  
Deelnemersnummer: 10500

Deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 15 april 2021, voor het project "Het ontrafelen van het mechanisme achter metabool programmeren door voeding vroeg in het leven" met aanvraagnummer AVD105002016484, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD kandidaat.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 april 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 april 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, (aanvullend DEC advies) ontvangen op 6 april 2016 en 7 april 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Digestion, absorption and bile acids	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	3688	16 % Matig 83 % Licht
Digestion, absorption and bile acids	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	200	100 % Matig

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade

**Datum**

26 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002016484

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

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

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

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



AVD 105002016485

1.



22 MAART 2016

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A/ Deusinglaan 1, [REDACTED]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Programmering van Metabool Syndroom door zwangerschapscholestase
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RuG                      |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl         |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 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
- Beschrijving dierproeven (1)

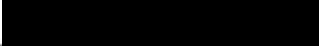
## 6 Ondertekening

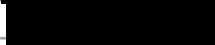
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

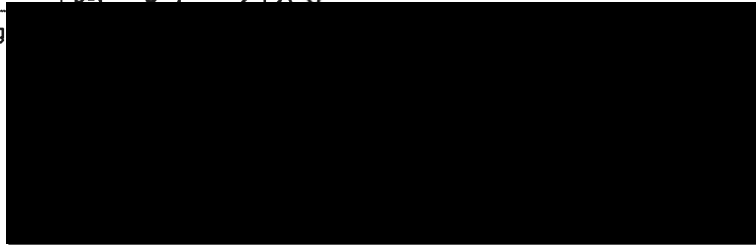
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 GRONINGEN

Datum 21-03-2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

The metabolic syndrome (MetS) is a disorder of energy utilization and storage, diagnosed by a co-occurrence of three out of five of the following medical conditions: abdominal obesity, elevated fasting plasma glucose (hyperglycemia), high serum triglycerides (hypertriglyceridemia), low high-density (HDL)-cholesterol/high low-density (LDL)-cholesterol levels, and elevated blood pressure. MetS increases the risk to develop cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke (Papakonstantinou, Lambadiari et al. 2013). The incidence of these so-called non-communicable diseases is rapidly increasing and they are a major cause of morbidity and mortality in modern societies.

Current therapeutic strategies have only a limited success and frequently do not result in complete reversal of either the MetS or its consequences. Preventive strategies are primarily required to reduce MetS prevalence and impact in humans. Although MetS usually takes years to decades to develop, the majority of presently born infants are exposed to influences in early life that increase their risk of developing MetS in adulthood. Fundamental insight into the origins of this so-called 'early-life programming' is of great importance to define preventive strategies for MetS development. Outcome from many epidemiological studies supports the concept of early-life programming, and links early life nutrition and metabolism to MetS risk in adulthood (Ravelli, Stein et al. 1976; Barker 1995; Barker 2000; Roseboom, van der Meulen et al. 2001; Calkins and Devaskar 2011; Ford and Long 2011).

[REDACTED]

It is generally believed that early-life programming is driven by epigenetic modifications (Gabory, Attig et al. 2011). Changes in metabolism induced by epigenetic modifications could hence induce MetS development in the offspring. However, as it is largely unresolved how genetic/environmental factors impose epigenetic modifications, the molecular and physiological mechanisms underlying early-life programming remain largely unresolved. We believe that fundamental insights will boost development of novel preventive and therapeutic strategies to interfere with early life programming, hence reducing human MetS development in the future.

[REDACTED] we have concentrated our research efforts to *delineate the environmental and genetic factors that determine MetS risk in later life, to elucidate the mechanisms underlying early-life programming, and to establish the window of sensitivity of established programming factors to define effective therapies to reduce MetS incidence*

[REDACTED]

[REDACTED] the current research project aims to understand the causes and consequences of metabolic programming by perturbed bile acid metabolism in early-life. This is of particular relevance for women that develop

intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP), because their offspring is programmed for MetS development in later life (Papacleovoulou, Abu-Hayyeh et al. 2013).

Although the etiology of ICP remains largely unresolved, it is considered as a multifactorial disorder with environmental, hormonal, and genetic contributions. During normal pregnancy there is a physiological rise in circulating bile acids that results from a reduction in hepatic bile excretion, causing a backflow of bile acids into the hepatocyte and bloodstream. This phenomenon is mechanistically explained by a lower expression of the major hepatic Bile Salt Export Pump (BSEP). Molecular studies have shown that pregnancy hormones (estradiol and progesterone) suppress BSEP mRNA expression by interfering with its transcriptional activator Farnesoid X Receptor (FXR) (Milona, Owen et al. 2010; Abu-Hayyeh, Papacleovoulou et al. 2013; Song, Vasilenko et al. 2014). When considering the aforementioned mechanisms, it is not surprising that human ICP is associated with supraphysiological increases in pregnancy hormone levels during pregnancy, as well as mutations in BSEP, FXR and the bile acid transporter Multi Drug Resistance Protein 3 (MDR3; mouse homolog is MDR2) (Dixon, Weerasekera et al. 2000; Keitel, Vogt et al. 2006; Van Mil, Milona et al. 2007; Dixon, van Mil et al. 2009; Abu-Hayyeh, Papacleovoulou et al. 2013).

Recent work has shown that ICP offspring is predisposed to develop MetS in adulthood (Papacleovoulou, Abu-Hayyeh et al. 2013; Martineau, Raker et al. 2014). However, the mechanisms of MetS development in ICP offspring remain unresolved. During ICP, the placenta and child are both exposed to high bile acid levels. As a consequence, independent mechanisms may converge and hence contribute to programming of MetS risk in the offspring (Geenes and Williamson 2009). MetS in ICP offspring develops because of pathophysiological adaptations in metabolism that presumably result from epigenetic changes in specific organs or tissues. Although it has been reported that systemic DNA methylation is altered in ICP offspring (Papacleovoulou, Abu-Hayyeh et al. 2013), it is unknown which organs/issues and gene promoters are affected. Moreover, the relationship between epigenetic changes in specific tissues and the physiological mechanisms that constitute the MetS phenotype in ICP offspring remains to be established. Epigenetic changes induced by ICP are in turn driven by physiological changes during pregnancy and/or lactation such as altered placental function, changes in maternal breastmilk, and/or the composition of maternal microflora (Backhed 2011; Cabrera-Rubio, Collado et al. 2012; Aagaard, Ma et al. 2014; Kozyrskyj, Kalu et al. 2015; Rautava 2015; Ussar, Griffin et al. 2015; Wright and Starkweather 2015; Zheng, Xiao et al. 2015; Vitek, Zelenkova et al. 2010; Fouts, Torralba et al. 2012; Alaish, Smith et al. 2013). These need to be addressed as research has shown that placental function, milk composition and maternal microflora can all contribute to programming of MetS risk.

In summary, the [REDACTED] in child, mother, and placenta by which ICP induces metabolic programming and subsequently increases MetS risk are poorly understood. In order to define successful therapies for ICP that ensure long-term health of human ICP offspring hence reducing the global incidence of MetS, detailed fundamental investigation of the [REDACTED] is needed.

---

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

The aim of this research is to understand the mechanisms underlying MetS risk in ICP offspring. We will investigate the pathophysiological adaptations that determine MetS risk in ICP offspring, as well as the [REDACTED] in ICP child, mother and placenta in relation to programming of MetS risk in ICP offspring.

[REDACTED]

[REDACTED]

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

MetS is a major health problem in modern societies and its incidence is rapidly increasing. It not only seriously impacts on the quality of life worldwide, but also imposes a financial and logistic burden to our healthcare system. Epidemiological studies have shown that a solid relationship exists between nutrition and metabolism in early life and MetS risk in adulthood. ICP has recently been identified as a risk factor for MetS development in humans. The underlying mechanisms and course of this 'early-life programming' are however poorly resolved and need to be elucidated in order to define preventive strategies to reduce MetS incidence in humans.

Fundamental insight into the [REDACTED] by which ICP impacts the metabolic health of the offspring is limited and should be improved to benefit our own research and that of fellow scientists. These insights are essential to optimize healthcare policy, and to define effective strategies to reduce MetS prevalence in humans. A lower MetS prevalence will in turn reduce morbidity and mortality and limit the cost of healthcare. Successful therapies will furthermore offer opportunities for the development of new drugs.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

This research aims to understand the mechanisms underlying MetS risk in ICP offspring. Given the lifespan of rodents, their proven usefulness for metabolic research for the human system, and the availability mouse strains that possess specific genetic properties, mouse models allow for detailed investigation of the origin of early-life induced metabolic programming within the timeframe of this project license.

For the purpose of this project, we will employ mouse models. ICP is multifactorial with environmental, hormonal, and genetic components. The contribution of these individual components has not been systematically addressed but is of importance in our mechanistic investigation of ICP-induced programming of MetS risk. Therefore we will employ genetically-altered, hormone-induced and dietary-challenged mice as ICP models. Previously published animal models for ICP (e.g. (Papacleovoulou, Abu-Hayyeh et al. 2013; Wu, Xu et al. 2015; Milona, Owen et al. 2010; Song, Vasilenko et al. 2014; Dixon, Weerasekera et al. 2000; Keitel, Vogt et al. 2006; Van Mil, Milona et al. 2007; Dixon, van Mil et al. 2009; Zhang et al. 2015) as well as epidemiological and clinical findings in human ICP form the basis for selection of models for maternal ICP.

The use of these different mouse models will enable us to dissect the role of different components on ICP-induced MetS risk in the offspring.

The first step in our mechanistic investigation is to characterize the course of MetS development in ICP offspring. To this end, we will perform a longitudinal analysis to monitor changes in the of MetS in ICP versus non-ICP offspring. Because these models are based epidemiological and clinical studies in human ICP and published fundamental work on ICP we expect that the ICP offspring will be predisposed to develop MetS. In addition to this, ICP offspring will be subjected to dedicated testing to reveal the origin of MetS development. Moreover, we will investigate the that potentially contribute to ICP-induced programming. To this end we will collect tissues, fecal microbiome samples, breastmilk and placenta from ICP mothers/offspring.

---

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

---

To dissect the contribution of individual components associated with human ICP we will employ different ICP models, i.e.

Our research on the mechanisms of early-life programming of MetS risk in ICP offspring addresses both the of ICP-induced MetS development, and that constitute this 'programmed' MetS risk. Because the of programming will be used to explain the mechanisms of MetS development, we will employ one 'type dierproef' that is composed of the following components:

1. Evaluation of the course of MetS development in ICP offspring.

ICP offspring will be generated and followed-up longitudinally into adulthood to define from what age MetS develops, and whether this occurs in both genders. To this end,



MetS development will be systematically analyzed at regular time points representing different life stages, i.e. early postnatal period, childhood, adolescence, and at two timepoints during adulthood, and once during adulthood be subjected to glucose and insulin tolerance tests. Female breeders will be sacrificed after weaning. Male breeders will be re-used whenever appropriate, and sacrificed when they cannot be used further. Offspring will be sacrificed at adult age.

2A. Investigation of the pathophysiological mechanisms of MetS risk in ICP offspring  
After the course and affected gender(s) of MetS development have been established, ICP offspring of appropriate gender will be subjected to dedicated physiological analysis at a timepoint just prior to manifestation of the MetS to reveal its pathophysiological origin. Offspring will be sacrificed at the end of these physiological analyses. Female breeders will be sacrificed after weaning. Male breeders will be re-used whenever appropriate, and sacrificed when they cannot be used further.

2B. Investigation of the [REDACTED] underlying early-life programming of MetS risk in ICP offspring.

Tissues/organs from ICP offspring/mothers/placenta will be collected for [REDACTED]. The investigation of the potential mechanisms of ICP-induced programming requires the sacrifice of ICP mothers and offspring and subsequent sample collection at three different timepoints, hence three independent cohorts will be used. Multiple tissues/samples will be collected at the each of these three timepoints: 1) ICP placenta, fetal organs and maternal microflora samples will be collected prior to birth; 2) ICP breastmilk and maternal microflora samples will be collected during weaning; 3) organs/tissues will be collected from ICP offspring of appropriate gender at a timepoint just prior to MetS manifestation. In case 3 female breeders will be sacrificed after weaning. Male breeders will be re-used whenever appropriate, and sacrificed when they cannot be further used.

---

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

---

The first step to fulfill our aim is to establish at what life stage first MetS develops in offspring of [REDACTED]. We will subsequently investigate the [REDACTED] of MetS in detail at an appropriate life stage using the appropriate [REDACTED] and investigate the [REDACTED] underlying ICP-induced programming. Development of MetS in male and/or female ICP offspring will be used as a go/no go criterium for the investigation of [REDACTED] underlying ICP-induced programming.

#### Milestones

1. Characterization of MetS development in ICP offspring, focusing on [REDACTED]
  2. Dissection of the role of [REDACTED] in ICP-induced programming of MetS risk
  3. Elucidation of the [REDACTED] in ICP offspring associated with MetS risk
  4. Elucidation of the [REDACTED] associated with ICP-induced programming of MetS in ICP offspring
-

Our laboratory and animal facility possess the staff, equipment and (technical) expertise required for proper design and execution of the procedures, and the analysis of the results.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Unraveling the mechanisms of MetS development in ICP offspring
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



al. 2014; Dixon, Weerasekera et al. 2000; Keitel, Vogt et al. 2006; Van Mil, Milona et al. 2007; Dixon, van Mil et al. 2009; Zhang et al. 2015) as well as epidemiological and clinical findings in human ICP form the basis for selection of models for maternal ICP. Specifically, we will employ [REDACTED]

[REDACTED] The use of these different mouse models will enable us to dissect the role of different components on ICP-induced MetS risk in the offspring. Because the [REDACTED] of programming will be used to explain the mechanisms of MetS development, we will employ one 'type dieproef' that is composed of the following components:

1. A longitudinal analysis in ICP offspring to define from what age MetS develops in ICP offspring, and which gender(s) is affected. Outcome from this analysis will reveal the course of MetS development and the affected gender. ICP offspring will be generated and followed-up longitudinally into adulthood and MetS development will be monitored. [REDACTED]

[REDACTED] Development of MetS in male and/or female ICP offspring will be used as a go/no go criterium for the investigation of [REDACTED] (2A and 2B).

2A. Investigation of the [REDACTED] underlying MetS development in ICP offspring using ICP offspring of affected gender(s) and appropriate age, as determined in the longitudinal analysis (1). These tests will be performed at a timepoint just prior to the manifestation of the MetS component only using the appropriate gender(s). Outcome of these studies will reveal the pathophysiological metabolic adaptations, and will be used to mechanistically explain MetS development in ICP offspring.

2B. [REDACTED] of the mechanisms underlying early-life programming of MetS risk in ICP offspring. This will be performed in parallel to 2A. Because the 'programming' mechanisms (described in section 3.1 of the 'projectvoorstel') operate in different developmental stages, i.e. during ICP pregnancy when the fetus/placenta are exposed to high bile acid levels, or during lactation when the offspring is exposed to ICP-breastmilk, we will collect samples for [REDACTED] during both pregnancy and weaning. Because tissue collection requires sacrifice of the animals, three independent cohorts (pregnancy, weaning, time of MetS) are required per ICP model. Placentophagy is common in mice, [REDACTED] of placenta therefore requires sample collection during pregnancy. Importantly, different tissues/samples will be collected during pregnancy and weaning to investigate multiple mechanisms. In addition to this, [REDACTED] should persist in later life to cause a change in metabolism. Therefore tissue will also be collected at the time that MetS was shown to first manifest to confirm that the [REDACTED] are maintained. These samples will also be used to confirm the contribution of specific organs/tissues to the pathophysiological mechanisms underlying MetS development, and to relate [REDACTED] in specific tissues to the [REDACTED] of MetS development. Outcome of these mechanistic investigations will be used to explain how maternal ICP results in programming of MetS risk in the offspring.

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

Based on epidemiological and clinical studies in human ICP and published animal models for ICP [REDACTED]

[REDACTED] The use of these different mouse models will enable us to dissect the role of different components on ICP-induced MetS risk in the offspring.

For 1, 2A and 2B ICP females will be mated with males to induce pregnancy. Prior to mating, a non-pregnant reference blood sample is drawn from each female. Body weight and food intake of the dams will be monitored regularly and blood and feces will be collected from dams during the third trimester of pregnancy to confirm ICP development. A maximum of 8 mL blood/kg body weight will be drawn from dams over a period of 14 days. Dams will be sacrificed

under general anesthesia after weaning of the offspring. Male breeders will either be offered for re-use by other researchers or sacrificed once they cannot be further used for reproductive purposes.

1. Longitudinal analysis. ICP offspring will be generated using the same procedure as described. Male and female offspring from ICP dams will be followed-up from birth and housed individually from weaning. Half of the offspring will be fed a customized diet to promote MetS development. Body weight and food intake will be monitored regularly.

To evaluate MetS development, analyses (all classified as 'licht' discomfort) will be performed at different life stages, i.e. at the end of childhood, at the end of adolescence, and at two different timepoints during adulthood. Animals will be housed individually during this longitudinal analysis to enable accurate and regular evaluation of body weight and food intake. This allows for careful monitoring of metabolic syndrome development during different life stages using regular time intervals and accurate evaluation of food intake. In case of blood collection, a maximum of 8 mL blood/kg body weight will be drawn over a period of 14 days.

The following analyses will be performed after an overnight fast (drinking water available):'

-glucose analysis in a small drop of blood collected by tail bleeding

-body weight measurement

-body composition analysis using MRI

Minispec-MRI will be performed in conscious animals during 0.5-3 minutes.

-indirect calorimetry

Animals will be placed in calorimetric cages during 72 hours to assess oxygen consumption and carbon dioxide production as measures for energy expenditure and substrate utilization. Feces produced during this analysis will be collected and analyzed for energy, lipid and bile acid excretion.

-blood sample collection for plasma insulin/triglyceride/(HDL-)cholesterol/bile acid analysis

At 19 weeks of age offspring will be subjected to a Glucose tolerance test (GTT) ('licht' discomfort).

Animals are subjected to an overnight fast (drinking water available). On the morning of the test, a control blood glucose and blood sample are drawn via tail bleeding. The animals subsequently receive a bolus of glucose (either by oral gavage or intraperitoneal injection). Blood glucose is measured in tail blood every 15 minutes during 180 minutes. In addition after 15, 30 and 45 minutes blood samples are drawn by tail bleeding for insulin analysis.

At 21 weeks of age offspring will be subjected to an Insulin tolerance test ('licht' discomfort).

Animals are subjected to an overnight fast (drinking water available). On the morning of the test, a control blood glucose and blood sample are drawn via tail bleeding. The animals subsequently receive a bolus of insulin (by intraperitoneal injection). Blood glucose is measured in tail blood after 5 minutes, and subsequently every 15 minutes during 120 minutes.

At 25 weeks of age offspring will be sacrificed under general anesthesia after a postprandial fast (i.e., in the light phase). They will receive <sup>13</sup>C-sodium acetate via the drinking water during the final 24 hours prior to sacrifice.

The longitudinal analysis will reveal at which life stage ICP offspring develops MetS, and which gender(s) is affected. The next step is to investigate the [redacted] of these metabolic changes. Based the outcome of the longitudinal analysis it will be decided at which life stage(s) [redacted] require investigation and whether males and/or females will be studied (go/no go).

2A. [redacted] of MetS development. ICP offspring will be generated using the same procedure as described. Male and/or female offspring (go/no go) from ICP dams will be followed-up from birth until the age at which development of MetS was first observed during the longitudinal analysis, and housed individually from weaning to enable accurate and regular evaluation of body weight and food intake. The offspring will be fed a customized diet to promote MetS development. Body weight and food intake will be monitored regularly. To reveal the [redacted] origin of MetS, two types of [redacted]

tests (A and B) will be performed at the timepoint just prior to when MetS was first observed in the longitudinal analysis. Because these physiological tests require organ/tissue and blood collection, animals will be sacrificed directly after completion of the test for further analysis.

-Physiological test A: oral or intraperitoneal administration followed by sampling of blood and/or bile ('licht' discomfort)

-Physiological test B: continuous intravenous infusion via a permanent jugular vein catheter in combination with sampling of blood and/or bile ('matig' discomfort)

List of possible [REDACTED] tests A:

- VLDL production. On the morning of the test, a control blood sample is drawn after which the animals receive an intraperitoneal injection with [REDACTED]. After 30, 60 and 240 minutes, blood samples are drawn. Directly following blood collection at t=240 minutes, the animals are sacrificed under general anesthesia. Tissues are quickly excised and stored until further analysis.

- A control blood sample is drawn after which the animals receive an intraperitoneal injection with either [REDACTED] or saline. A lipid emulsion is subsequently administered by oral gavage. After 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes, small blood samples are drawn. Directly following blood collection at t=240 minutes, the animals are sacrificed under general anesthesia. Tissues are quickly excised and stored until further analysis.

- [REDACTED] Animals will receive a bolus of [REDACTED] under general anesthesia. Small blood samples will be obtained from the tail vein every 24 hours for 10 days. Starting day 7 after cholesterol administration, animals will receive [REDACTED] acetate via the drinking water. On day 10, animals will be anesthetized and placed on a heating pad to maintain body temperature during cannulation. After ligation of the common bile duct close to the duodenum, the gallbladder will be cannulated under general anesthesia. Bile will be collected for 30 minutes after which the animals are sacrificed.

- Bile cannulation. Animals will be anesthetized and placed on a heating pad to maintain body temperature during cannulation. After ligation of the common bile duct close to the duodenum, the gallbladder will be cannulated under general anesthesia. Bile will be collected for 30 minutes after which the animals are sacrificed.

- [REDACTED] Animals will receive a bolus of [REDACTED] under general anesthesia. Blood samples will be obtained from the tail vein after 12, 24, 36 and 48 hours. After 60 hours, animals will be anesthetized and placed on a heating pad to maintain body temperature during cannulation. After ligation of the common bile duct close to the duodenum, the gallbladder will be cannulated under general anesthesia. Bile will be collected for 30 minutes after which the animals are sacrificed.

List of possible [REDACTED] tests B:

- [REDACTED] Animals are implanted with a jugular vein catheter under general anesthesia and allowed a recovery period of at least 4 days. They are placed in special cages and subjected to an overnight fast (drinking water available). On the morning of the test, a control blood glucose and sample are drawn via tail bleeding and the infusion lines are connected to the external part of the canula under brief isoflurane anesthesia. During 360 minutes, [REDACTED]

[REDACTED] is measured in tail blood every 15 minutes. In addition, every 30 minutes, a blood sample is drawn by tail bleeding and spotted on filter paper. Voluntary urine samples are also collected over 30-minute intervals as the animals continuously urinate during the test on the filter paper that is placed under the cage. At the end of the test, the infusion lines are disconnected and the animals are sacrificed under general anesthesia. Tissues are quickly excised and stored until further analysis.

- VLDL catabolism. Animals are implanted with a jugular vein catheter under general anesthesia and allowed a recovery period of at least 4 days. On the morning of the test, a control blood sample is drawn and the infusion lines are connected to the external part of the canula under brief isoflurane anesthesia. During 90 minutes, animals are infused with a solution containing radiolabeled VLDL. After 1, 5, 10, 30, 60 and 90 minutes, blood samples are drawn.

Directly following blood collection at t=90 minutes, the infusion lines are disconnected and the animals are sacrificed under general anesthesia. Tissues are quickly excised and stored until further analysis.

- Fatty acid turnover. Animals are implanted with a jugular vein catheter under general anesthesia and allowed a recovery period of at least 4 days. On the morning of the test, a control blood sample is drawn and the infusion lines are connected to the external part of the canula under brief isoflurane anesthesia. During 360 minutes, animals are infused with a solution containing <sup>13</sup>C-palmitate. After 120, 300 and 360 minutes, blood samples are drawn. Directly following blood collection at t=360 minutes, the infusion lines are disconnected and the animals are sacrificed under general anesthesia. Tissues are quickly excised and stored until further analysis.

- Bile cannulation and infusion. Animals are implanted with a jugular vein catheter under general anesthesia and allowed a recovery period of at least 4 days. Animals will be anesthetized and placed on a heating pad to maintain body temperature during cannulation. After ligation of the common bile duct close to the duodenum, the gallbladder will be cannulated under general anesthesia. Bile will be collected for 30 minutes, after which the animals will be continuously infused with bile salts for 3 hours via the jugular vein. Bile will be collected during bile salt infusion. At the end of the infusion period the animals are sacrificed.

2B. [REDACTED] of MetS programming. The [REDACTED] of programmed MetS risk in ICP offspring will be studied in parallel to the [REDACTED] of MetS development (2A). ICP offspring will be generated using the same procedure as described. To investigate the [REDACTED] that contribute to ICP-induced metabolic programming, we will collect samples at 3 different life stages, and therefore 3 independent ICP cohorts are required.

- [REDACTED] of ICP.

At day 18.5 of pregnancy, dams will be sacrificed under general anesthesia. Maternal and fetal blood and organs, as well as placenta will be collected for [REDACTED]

[REDACTED] during ICP-lactation.

After delivery, maternal breastmilk will be collected once during the first week of lactation (100 uL; 'matig' discomfort). To this end, the dam will be separated for 2 hours from her pups, during which the pups are housed in a temperature-controlled environment. First a blood sample will be drawn after which the dam receives an injection of oxytocin. Then milk is collected during 5-10 minutes under general anesthesia using an adjusted human milking device. During milking the dam is placed on a heating mat to maintain body temperature.

After 2 weeks of lactation, dams and offspring will be sacrificed under general anesthesia. Maternal and fetal blood and organs will be collected for [REDACTED]

[REDACTED] Maternal and offspring feces will be collected from intestines for [REDACTED]

- [REDACTED] at the time of MetS manifestation.

Male and/or female offspring (go/no go) from ICP dams will be followed-up from birth until the age at which development of MetS was first observed during the longitudinal analysis, and housed individually from weaning to enable accurate and regular evaluation of body weight and food intake. The offspring will be fed a customized diet to promote MetS development. Body weight and food intake will be monitored regularly. At the timepoint just prior to when MetS was first observed in the longitudinal analysis, offspring will be sacrificed under general anesthesia. Blood and organs will be collected for [REDACTED]

[REDACTED] Feces will be collected from intestines for [REDACTED]

---

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

The number of animals required for these procedures is based on power calculations using historical data from our laboratory. The use of mouse models for this research reduces the number of breeding pairs required to generate sufficient numbers of female and male offspring required for our studies, because rodents generate multiple offspring per pregnancy. Male breeders and offspring of non-affected gender will be re-used whenever possible.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

All animals will either be bred in our own facility, or purchased from commercial sources (from both inside and outside the EU). [REDACTED]

We will employ female and male mice of reproductive age as breeders to generate offspring. Given the inter-dam variation we consider each litter as an experimental unit for statistical analyses. Therefore our Power Analysis is based on the number of pregnant females. The parameters used for Power Analysis are: alpha 0.05, power 0.90, effect 25% and VC 15%. This results in 9 pregnant females per condition. Our experience is that 2 out of 3 females actually become pregnant. Male breeders can be repetitively used. Taken this into account, we expect that on average  $(9 \times 3/2) = 14$  females are required to generate the amount of female/male off-spring required to evaluate the impact of ICP on metabolic health for each ICP model (and thus that 5 females will not become pregnant). Male breeders will be re-used, and we expect that, on average, one male will be mated with at least 2 females. Therefore 7 males are required to generate sufficient offspring. Appropriate genetic controls for the ICP dams is required, this will consequently require a plurality of 14 female and 7 male breeders. For each 9 successful pregnancies about 18 female and 18 male offspring will be generated. [REDACTED]

Because each ICP model needs a control group we will need twice as much female breeders and ICP offspring. [REDACTED]

The procedures and associated discomfort for individual animals and estimated maximal numbers for the longitudinal analysis (1) will be:

The procedures and associated discomfort for individual animals and estimated maximal numbers for the physiological tests in ICP offspring (2A) will be:  
Genetic ICP dams (BSEP): blood draw (2x), mating, weighing, sacrifice at weaning; leading to 54 (9x3x2) animals experiencing 'licht' discomfort.  
Dietary ICP dams: diet, blood draw (2x), mating, weighing, sacrifice at weaning; leading to 36 (9x2x2) animals experiencing 'licht' discomfort.  
Hormonal ICP dams: diet, blood draw (2x), mating, i.p. injections, weighing, sacrifice at weaning; leading to 36 (9x2x2) animals experiencing 'licht' discomfort.  
Non-pregnant females: blood draw (1x), mating, weighing, sacrifice; leading to 70 (5x7x2) animals experiencing 'licht' discomfort.



Male breeders: mating; leading to 98 (7x7x2) animals experiencing 'licht' discomfort. Male breeders will be re-used whenever possible, we expect that they will on average be mated with 2 females.

ICP and control offspring subjected to [REDACTED] test A: 216 (36x3x2) animals experiencing 'licht' discomfort.

ICP and control offspring subjected to [REDACTED] test B: 216 (36x3x2) animals experiencing 'matig' discomfort.

[REDACTED] offspring from genetic ICP dams: sacrifice at weaning; leading to 72 (36x2) animals experiencing 'terminal' discomfort.

In total, the [REDACTED] tests will maximally involve 510 animals experiencing 'licht' discomfort, 216 animals experiencing 'matig' discomfort and 72 animals experiencing 'terminal' discomfort. The numbers of ICP offspring represent the 'worst case scenario' because only the affected gender will be used (go/no go).

[REDACTED]

In total, the [REDACTED] will maximally involve 378 animals experiencing 'licht' discomfort, 63 animals experiencing 'matig' discomfort, and 756 animals experiencing 'terminal' discomfort. The numbers of ICP offspring represent the 'worst case scenario' because only the affected gender will be used for [REDACTED] investigation at the time of MetS manifestation (go/no go).

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Male breeders can be used repetitively to generate offspring for multiple procedures. Male breeders that can no longer be used for reproductive purposes, as well as offspring from non-affected gender, can be offered for re-use by other researchers. Male animals of reproductive age and appropriate genetic background from other experiments that have not been subjected to any treatment can potentially serve as breeders for these procedures.

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

---

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

---

Verfijning: Procedures are designed in such a way to minimize stress and discomfort. Anesthesia and painkilling will be employed whenever appropriate. In case anesthesia is not absolutely necessary, alternative approaches will be used, e.g. tail bleeding instead of retro-orbital puncture. Procedures will be executed by trained and experienced staff.

Vervanging: MetS is a systemic disorder that involves intra organ/tissue interactions. The study of this disease therefore requires the use of intact organisms. Moreover the study of ICP requires an intact maternal-fetal/newborn interaction. Altogether, the current studies do not allow for alternative approaches for animal experimentation.

Vermindering: Male breeders will be re-used whenever possible. For the longitudinal analysis, we will use the same cohort of ICP offspring for multiple measures of metabolic health. Whenever possible [REDACTED] we will use the same cohort of ICP offspring for multiple procedures and analyses. We will perform power analyses using historical data available in our laboratory to define the minimal amount of animals required for these studies. [REDACTED] tests and analytical techniques available in our laboratory have been optimized in such way that tissues/blood collected from 1 animal retrieves n=1 outcome (i.e., pooling of samples is not required).

---

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

---

Animals will be handled and monitored on a regular basis to reduce stress and to identify potential discomfort as early as possible. For procedures requiring invasive manipulation, anesthesia and/or painkilling will be applied. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

---

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

---

We have performed thorough analysis of existing literature and continue to monitor newly published work in this field of research. We will only perform procedures that have not been executed as such according to the literature.

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

---

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

---

Nee

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

---

Animals need be housed individually to allow for of quantification of food intake, to allow for feces collection, and to standardize the number of animals per cage. This is critical as differences in the number of animals per cage may impact on systemic energy metabolism (e.g. more animals per cage reduces heat loss). Moreover, as 2A and 2B will provide mechanistic insights into phenotypic observations in the longitudinal analyses, the conditions including housing should be in accordance. For tests that require jugular vein catheters, the use of paper tunnels as cage enrichment should be omitted because of potential

---

damage to the external part of the canula.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress and discomfort

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individual housing may cause stress/discomfort. Dietary/hormonal treatment may induce unexpected stress/discomfort, this is however very unlikely.

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

We will monitor the animals regularly and reconsider continuation of treatments in case of unacceptable stress/discomfort.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- In case animals exhibit abnormal behavior (e.g. inactivity, excessive stress signals), abnormal posture (ruffled fur, hunched back) or excessive weight loss (>15%) they will be terminated to prevent further discomfort.
- During surgery, animals will be terminated in case of excessive bleeding.

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

<10% (overall)

### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht-Matig

All procedures involving breeders are in principle classified as 'licht' discomfort. In case of longitudinal analysis of MetS development, animals will be allowed to recover until the next set of analyses is performed. It is estimated that 52% of the procedures 'licht' discomfort, 36% imposes 'terminal' discomfort, and 12% of the procedures imposes 'matig' discomfort (see section B, de dieren). Male breeders that can no longer be used for breeding and offspring of non-affected gender will be offered to other researchers.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

The animals will be sacrificed to allow for organ/tissue/blood collection.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

## Format DEC-advies

---

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

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RUG code **8046**)
2. Titel van het project: **Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy.**
3. Titel van de NTS: **Programmering van metabool syndroom door zwangerschapscholestase.**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
  - mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC op : **13-01-2016**
  - aanvraag compleet: **13-01-2016**
  - in vergadering besproken op : **21-01-2016**
  - anderszins behandeld: **14-03-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **25-01-2016 tot 14-03-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **14-03-2016**
  - advies aan CCD: **06-04-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum:
  - Plaats:
  - Aantal aanwezige DEC-leden:
  - Aanwezig:
  - Strekking van de vraag / vragen: Strekking van het (de) antwoord(en):

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **25-01-2016**

- Strekking van de vraag / vragen:

- **Algemene opmerking t.a.v. de aanvraag:**

In het kader van de ethische afweging m.b.t. deze aanvraag is door de DEC gesproken over het ethisch belang van dit werk. De DEC merkt op dat het 'directe' belang bij dit werk – doelend op uitkomsten van het onderzoek die per direct voordeel opleveren voor de gezondheid van de mens- verminderd aanwezig is. Immers, eventuele voordelen zullen zich pas heel veel later in de levensloop van nakomelingen openbaren. De DEC hoort graag uw visie op dit ethische aspect van het onderzoek, dit om tot een goede vollediger ethische afweging te komen.

- **Opmerkingen/vragen t.a.v. projectvoorstel:**

Bij 2. categorie: enkel fundamenteel onderzoek is aangekruist, terwijl translationeel onderzoek ook van betekenis lijkt. Hoe ziet u dit?

- **Opmerkingen/vragen t.a.v. bijlage 1**

[Redacted text]

- **Opmerkingen/vragen t.a.v. NTS**

Onder 2.1 is enkel fundamenteel onderzoek aangekruist, terwijl translationeel onderzoek ook van betekenis lijkt. Hoe ziet u dit?

- Datum antwoord: **14-03-2016**

- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

## 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja.**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. **Ja.**

3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja, het betreft immers een door de CCD goedgekeurde DEC.**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **NVT.**

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en). **Ja.**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **substantieel.**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. **NVT.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Zo wordt zoveel als mogelijk monsternamen bevorderd binnen hetzelfde dier [REDACTED] [REDACTED] ondermeer door sequentiële uitvoering van de proefnemingen beschreven in de bijlage. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven ondermeer door adequate pijnbestrijding in voorkomende gevallen. Het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Het metabool syndroom is een belangrijke risicofactor voor hart- en vaatziekten en suikerziekte type 2. Bij de mens zijn hart- en vaatziekten en suikerziekte belangrijke oorzaken van sterfte en de prevalentie hiervan neemt toe. Alhoewel er preventieve en curatieve mogelijkheden zijn bij het metabool syndroom in individuele gevallen speelt ook 'early-life programming' een belangrijke rol. Het onderhavige onderzoek heeft met name als doel het effect van zogenoemde 'early-life programming' op het voorkomen van het metabool syndroom bij nakomelingen in beeld te brengen in een muismodel van drachtigheidscholestase teneinde maatregelen ter preventie beter vorm te kunnen geven. Een te ontwikkelen model van drachtigheidscholestase zal worden gebruikt om de programmering van het metabool syndroom in beeld te brengen. Goed is uitgewerkt via welke wegen het onderzoek wordt ingestoken, waarbij goede aandacht is voor duidelijk omschreven go/no go momenten. Zo zal het onderzoek bij een bepaald levensstadium en geslacht niet worden uitgevoerd wanneer de inductie van het metabool syndroom hierbij faalt. In het volgende go/no go beslismoment zal onderzoek naar het pathofysiologische mechanisme van een metabool pad achterwege blijven als de screening hiervan negatief verloopt. Eveneens zijn de interventies met verlagers van de galzuurconcentratie in het perifere bloed alsmede anti-oxidanten go/no go momenten. De onderzoeksgroep is bij uitstek gekwalificeerd voor het uitvoeren van dit onderzoek en beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

Het voorgestelde proefdieronderzoek aan de muis heeft als doel het ontrafelen van de rol van 'early-life programming' van het metabool syndroom bij



nakomelingen en overeenkomstig de vraagstelling in het projectvoorstel aanvraagformulier is het onderzoeksproject gefundeerd op vier onderzoeksdoelen te weten [REDACTED]

[REDACTED] Per onderzoeksdoel is de wetenschappelijke navolgbaarheid goed in beeld gebracht en zijn de aantallen benodigde dieren inzichtelijk onderbouwd met daarbij aandacht voor de 3 V's. . Naar de mening van de DEC-RuG is het aldus geworden tot een toetsbare eenheid ten aanzien van het ontrafelen van de rol van 'early-life programming' van het metabool syndroom bij nakomelingen.

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van muizen en het daarbij beschreven ongerief. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project mogelijk voordelen opleveren voor de preventie van metabool syndroom uitgesplitst naar leeftijdscategorie (inclusief 'early-life programming') alsmede leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën. De onderzoekers hebben daarmee – in antwoord op de vraag dienaangaande vanuit de DEC - aangetoond dat hun onderzoek naar het voorkomen van aandoeningen op latere leeftijd tot zinvolle en maatschappelijk relevante resultaten kan leiden.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-RuG tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toets- en toelaatbaar is en derhalve adviseert zij de CCD tot vergunningverlening.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A/ Deusinglaan

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016485

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016485. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A/ Deusinglaan [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy  
Titel niet-technische samenvatting: Programmering van Metabool Syndroom door zwangerschapscholestase  
Naam DEC: DEC-RuG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: GRONINGEN



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A/ Deusinglaan

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016485

**Bijlagen**

2

Datum 18 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 maart 2016

Vervaldatum: 17 april 2016

Factuurnummer: 16700485

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016485	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 31 maart 2016 16:10  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag bij DEC advies AVD105002016485 RUG code 8046

Geachte leden van DEC RUG,

Bij de CCD is een aanvraag voor projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project: Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, met aanvraagnummer AVD105002016485. Bij u waarschijnlijk bekend onder de code 8046.

Allereerst wil de CCD u bedanken voor uw uitgebreide advies. U adviseert de CCD om een voorwaarde aan de projectvergunning te verbinden; namelijk dat de dieren maximaal 48 uur in een metabole kooi gehuisvest mogen worden.

In de aanvraag wordt beschreven dat de dieren gedurende 72 uur in een calorimetrische kooi geplaatst worden. Is dit waar de DEC een beperking van 48 uur aan wil verbinden?

Voor zover bij ons bekend blijven de dieren bij een calorimetrische meting in de thuishok en wordt slechts de deksel aangepast, en heeft dit geen nadelige impact op het welzijn van het dier of zorgt dit voor extra ongerief.

ter aanvulling zouden wij graag van u vernemen waarom u adviseert om deze voorwaarde aan de vergunning te verbinden.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 6 april 2016 9:19  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: vraag bij DEC advies AVD105002016485 RUG code 8046

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Het blijkt dat de aanvrager in de meest recente versie van de bijlage een aanpassing heeft gedaan waarbij de passage m.b.t. gebruik metabole kooien is verwijderd. De DEC-RUG verzoekt aanvragers altijd nadrukkelijk om aan te geven of er tekst is veranderd, waar die is veranderd en hoe de nieuwe tekst eruit ziet. De aanvrager heeft in de laatste versie verzuimt om dit aan te geven en de DEC was niet alert genoeg op de kennelijke aanpassing. Na evaluatie blijkt dat het advies kan blijven staan, maar dat inderdaad de voorwaarde kan komen te vervallen. Excuses voor deze verwarring. Wij sturen u via Net FTP een aangepast DEC advies (file naam: ' DEC advies AVD105002016485\_ [REDACTED]

Vriendelijk groeten,  
Aalzen de Haan  
Secretaris DEC-RUG

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** donderdag 31 maart 2016 16:10  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** vraag bij DEC advies AVD105002016485 RUG code 8046

Geachte leden van DEC RUG,

Bij de CCD is een aanvraag voor projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project: Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, met aanvraagnummer AVD105002016485. Bij u waarschijnlijk bekend onder de code 8046.

Allereerst wil de CCD u bedanken voor uw uitgebreide advies. U adviseert de CCD om een voorwaarde aan de projectvergunning te verbinden; namelijk dat de dieren maximaal 48 uur in een metabole kooi gehuisvest mogen worden. In de aanvraag wordt beschreven dat de dieren gedurende 72 uur in een calorimetrische kooi geplaatst worden. Is dit waar de DEC een beperking van 48 uur aan wil verbinden?

Voor zover bij ons bekend blijven de dieren bij een calorimetrische meting in de thuishooi en wordt slechts de deksel aangepast, en heeft dit geen nadelige impact op het welzijn van het dier of zorgt dit voor extra ongerief.

ter aanvulling zouden wij graag van u vernemen waarom u adviseert om deze voorwaarde aan de vergunning te verbinden.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 18 april 2016 12:16  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag aanvullende toelichting DEC advies AVD105002016485

Geachte leden van DEC-RUG,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft de aanvraag "Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy", met aanvraag nummer AVD105002016485 Interne RUG code 8046.

U heeft al een inhoudelijke vraag beantwoord over deze projectaanvraag, maar bij de behandeling is gebleken dat er behoefte is aan een toelichting op de ethische afweging. Dit om het dossier volledig te maken. U beschrijft in het advies dat u met de onderzoeker heeft gecorrespondeerd, en in een algemene opmerking ten aanzien van de aanvraag heeft u de onderzoeker gevraagd om een visie op het ethisch aspect van dit onderzoek om dat het "directe belang" van dit werk verminderd aanwezig is. Het antwoord van de onderzoeker is niet opgenomen in het DEC advies, wij vernemen graag van u de visie van de onderzoeker,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 18 april 2016 12:24  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: vraag aanvullende toelichting DEC advies AVD105002016485

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Hierbij stuur ik u het antwoord van de onderzoeker (weergegeven in 'bold') t.a.v. het ethische aspect. Zie tekst hieronder.

Vr. gr.  
[REDACTED]  
[REDACTED]

***'Algemene opmerking t.a.v. de aanvraag:***

In het kader van de ethische afweging m.b.t. deze aanvraag is door de DEC gesproken over het ethisch belang van dit werk. De DEC merkt op dat het 'directe'

belang bij dit werk – doelend op uitkomsten van het onderzoek die per direct voordeel opleveren voor de gezondheid van de mens- verminderd aanwezig is.

Immers, eventuele voordelen zullen zich pas heel veel later in de levensloop van nakomelingen openbaren. De DEC hoort graag uw visie op dit ethische aspect van het onderzoek, dit om tot een goede vollediger ethische afweging te komen.

***Ik begrijp uw discussie over het directe belang. Zoals in de achtergrond van de projectaanvraag is beschreven zijn de bestaande therapieën voor de behandeling van het Metabool Syndroom slechts in beperkte mate succesvol. De mogelijkheden om de incidentie van Metabool Syndroom op korte termijn terug te dringen zijn dus niet/onvoldoende beschikbaar. Wanneer het ontstaan van Metabool Syndroom wordt voorkomen, zal onderzoek dat kan bijdragen aan preventieve strategieën mogelijk meer voordeel opleveren voor de gezondheid van de mens dan de bestaande therapieën. Daarnaast zal preventie leiden tot een verlaging van de kosten voor het onderzoek naar/vaststellen van Metabool Syndroom bij kinderen van moeders met zwangerschapscholestase, en de reeds bestaande morbiditeit op het moment van diagnose voorkomen. Daarnaast kunnen de fundamentele inzichten die dit onderzoek zal opleveren over de relatie tussen [REDACTED]***

***[REDACTED] ontregelen mogelijk ook op kortere termijn tot gezondheidswinst bij de mens leiden. Wanneer deze mechanismen ook optreden bij andere vormen van cholestase kunnen de nieuwe inzichten mogelijk bijdragen aan verbeterde therapieën voor deze aandoeningen. Samenvattend ben ik van mening dat, gezien de huidige beperkingen voor therapeutische interventie, het belang van dit onderzoek het gebruik van dierproeven rechtvaardigt. '***

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** maandag 18 april 2016 12:16  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** vraag aanvullende toelichting DEC advies AVD105002016485

Geachte leden van DEC-RUG,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft de aanvraag "Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy", met aanvraag nummer AVD105002016485 Interne RUG code 8046.

U heeft al een inhoudelijke vraag beantwoord over deze projectaanvraag, maar bij de behandeling is gebleken dat er behoefte is aan een toelichting op de ethische afweging. Dit om het dossier volledig te maken. U beschrijft in het advies dat u met de onderzoeker heeft gecorrespondeerd, en in een algemene opmerking ten aanzien van de aanvraag heeft u de onderzoeker gevraagd om een visie op het ethisch aspect van dit onderzoek om dat het "directe belang" van dit werk verminderd aanwezig is. Het antwoord van de onderzoeker is niet opgenomen in het DEC advies, wij vernemen graag van u de visie van de onderzoeker,

Met vriendelijke groet, ██████████

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen  
[Redacted]  
A. Deusinglaan 1  
[Redacted]  
9713 AV GRONINGEN

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016485

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 26 april 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy" met aanvraagnummer AVD105002016485. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 april 2016 en 18 april 2016, hebben wij aanvullend advies aan de DEC gevraagd.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 1 april 2021 hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 april 2016. 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 6 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft een herzien advies ingestuurd waarbij de aanvullende voorwaarde is vervallen. Op 18 april 2016 heeft de DEC op ons verzoek de correspondentie met de onderzoeker in meer detail weergegeven. 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. Aangevuld met twee algemene voorwaarden. 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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en woonplaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Programming of Metabolic Syndrome by Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy" met aanvraagnummer AVD105002016485, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 maart 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 6 April 2016, ontvangen op 6 april 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, (aanvullend DEC advies) ontvangen op 18 April 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Unraveling the mechanisms of MetS development in ICP offspring	Muizen (Mus musculus)	2394	36% Terminaal 12% Matig 52% Licht	

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade



**Datum**

25 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002016485

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

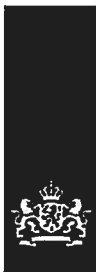
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

Inventaris Wob-verzoek W16-18S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016486</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
4	Niet technische samenvatting oud				x			x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie aanvulling aanvraag				x		x		
9	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
10	Niet technische samenvatting	x		x					
11	Vraag n.a.v. DEC-advies + reacties DEC				x		x		
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

AVD 105002016486



22 MAART 2016

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   10500																
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>RUG</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>01179037</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>A. Deusinglaan 1, [REDACTED]</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713AV   GRONINGEN</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL80ABNA0446049352</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	RUG	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	01179037	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]	Postbus		Postcode en plaats	9713AV   GRONINGEN	IBAN	NL80ABNA0446049352	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
Naam instelling of organisatie	RUG																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	01179037																	
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]																	
Postbus																		
Postcode en plaats	9713AV   GRONINGEN																	
IBAN	NL80ABNA0446049352																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 4 - 2016 |
| Einddatum  | 1 - 4 - 2017 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie rondom bij nieuwe deels degradeerbare chirurgische matjes
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                      |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl         |

## 4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*


## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De 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 GRONINGEN

Datum 21 - 03 - 2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

The massive formation of fibro-connective tissue around regular non-absorbable meshes is held responsible for patient complaints concerning restriction in mobility of the abdominal wall. Combining the needs for reduction of mesh material whilst retaining the required strength resulted in composite meshes, in which absorbable and non-absorbable materials are combined. [REDACTED] gives acute strength during the first weeks after implantation. When the absorbable residue of the mesh is replaced by collagen fibers only a low-weight non-absorbable part ensures permanent strength in combination with low patient morbidity. Reduction of the mesh material by replacing non-absorbable material with [REDACTED] material gives a combination of acute strength, long term stability and a more flexible fibro-connective abdominal plate. Therefore, the future for the use of [REDACTED] materials in abdominal wall reconstructive surgery lies in [REDACTED] mesh grafts.

Apart from the need to limit the formation of fibrosis around meshes, absorbable materials are known for their infection resistance, often associated with their increased induction of vascularization. The specific composite to be evaluated consists [REDACTED]

The combination of improved strength and vascularity provided by composite meshes may lend support to reduced wound complications in complex abdominal wall repairs, yielding a durable quality repair for the patient and potentially with an ability to clear bacteria in infection. If improved bacterial clearance can indeed be demonstrated, the composite surgical mesh would provide the first composite based material with demonstrated clearance also offering high strength in soft tissue repair.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

The primary aim of this study is to compare two composite devices (the experimental composite mesh and a commercially available composite mesh, both containing a [REDACTED] and two non-composite mono-filament knitted polymer meshes [REDACTED] with regard to:

1. Biomaterial associated infection - clearance kinetics
2. Inflammatory responses in the presence of bacteria
3. Angiogenesis in the presence of bacteria

### 3.3 Belang

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



doelstelling(en).

Societal benefit]: Biomaterial associated infections (BAI) have a relatively low incidence rate (1-2% in primary surgical mesh application) but the number of patients is very high (e.g. 1 million hernia meshes applied in the US). The consequences of BAI are enormous: a patient with an infected implant starts a series of hospital visits and antibiotic use, with the almost certain outcome that the infected implant will have to be replaced at high costs and great discomfort for the patient (revision surgery).

In the treatment of abdominal wall hernias in high infection risk patients (infection incident rates >30% are not unusual e.g. in case of revision surgery or co-morbidities like diabetes and obesity) biological degradable meshes are prescribed which showed to be infection resistant. These are however extremely expensive. For that reason composite meshes, which provide [REDACTED] parts in combination with a non-resorbable polymer mesh, are promising. These meshes are mainly indicated to reduce fibrotic encapsulation, but might also reduce infection as a result of the degradable parts of the material.

Scientific benefit: Apart from the societal and medical impact new [REDACTED] meshes may have, the reason why degradable biomaterials would have inherent antimicrobial properties is unclear. Therefore it is necessary to study the inflammatory reaction in combination with the clearance of infection. This is the reason why this study is aiming to get simultaneous infection and inflammation information during the course of the infection by using sophisticated imaging technologies using activatable matrix metalloproteinases (MMP) and angiogenesis agents in combination with bioluminescent bacteria.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

#### 3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

In the project the performance will be studied of an experimental [REDACTED] mesh as compared to a predicate composite mesh and two mono-filament non-composite meshes. The model used is an established murine model [1-3] to study inflammation and infection around a subcutaneously implanted biomaterial (such as a surgical mesh in our case).

The experimental mesh is [REDACTED]

The predicate mesh is a commercially available Ethicon PHYSIOMESH™ - comprised of dense, monofilament [REDACTED]

[REDACTED] to provide bond between the films and the mesh, with an additional dyed (D&C Violet No. 2) [REDACTED] film marker.

The non-composite meshes comprise a dense, [REDACTED], macro-porous construct mesh and a dense, [REDACTED] polypropylene, macro-porous construct.

The performance of all 4 types of meshes with respect to clearance of infection, induced inflammation and vascularization at different time points will be studied during 28 days. This will give detailed information about the relationship between infection clearance and inflammation in case of absorbable and non-absorbable meshes.

[REDACTED]

---

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

---

In order to get information about the infection persistence and inflammation around the meshes in mice, and to compare these parameters for a number of different mesh types, both *in vivo* imaging and *ex-vivo* histology will be used. This animal model is identical for all mesh types included in this study and is basically a study in mice with subcutaneously implanted meshes.

First for monitoring *in vivo* infection persistence, mice with implants will be inoculated by bioluminescent bacteria (*Staphylococcus aureus*). The radiance of the bioluminescence coming through the skin and detected by a sensitive camera (IVIS Spectrum) is a measure of the number of viable bacteria around the mesh. This will be measured 7 times during 28 days, a period that is sufficiently long for allowing clearance of infections in mice and the relevant foreign body immune responses.

Second, the immune response during this period of time is measured by the use of two types of fluorescent agents. The first agent is an activatable fluorescence moiety that becomes fluorescent after cleavage by MMP's: typical proteases secreted by infiltrated immune cells like polymorphonuclear cells and macrophages to dissolve connective tissue for increased cell infiltration. The second fluorescent agent is a so called " blood pool" agent, that circulates in the blood until it is entering an inflamed area, characterized by increased vascularity and vascular permeability, where it will accumulate. Both agents are injected at three times, followed by fluorescence imaging.

Third, after 28 days mice will be sacrificed and biopsies will be taken from the tissue around the implant, including the implant. These samples will be separated: one part will be applied for culturing, giving a second indication of infection persistence. The second part will be processed for histology: hematoxylin-eosin staining will reveal the infiltration of inflammatory cells around the remnants of the mesh, whereas immuno-histological staining with anti-MMP antibodies will deliver a validation towards the imaging of MMP-agents.

These procedures will be carried out for five groups of mice comprising a total of 60 animals (Balb/c strains with competent immune system) Therefore mice will be implanted with mesh samples of 8 mm diameter, implanted in a subcutaneous channel on the dorsal side, one sample each animal. The first group of 15 mice will get experimental [REDACTED] meshes, the second group of 15 mice will get predicate meshes, whereas the third group of 10 mice will get no mesh at all (but a subcutaneous channel will be created). The last two groups of mice will get non-composite meshes: one group of 10 mice a [REDACTED] mesh, the other a [REDACTED] mesh. Five mice from the first three groups will not be inoculated with bacteria, whereas all other mice will be inoculated with  $5 \times 10^7$  bioluminescent *S. aureus* Xen36 by needle injection immediately after implantation and wound closure with tissue glue.

---

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

---

The project will exist of two consecutive implantation and imaging periods in order to distribute workload, especially with regard to the frequent imaging sessions. The first implantations will involve the animal groups receiving the composite meshes and sham implantation, the second implantation series involves the two animal groups receiving the non-composite meshes. Although the project is performed in two consecutive stages the data obtained can be compared with each other to the full extent, by complying with the concepts of reproducibility as guaranteed by the solid experimental setup. We do not intend to adapt the second stage based on experiences in the first stage. However, the results obtained in the first stage will be evaluated against the expectations described in 3.1 Achtergrond. If the expectations are not sufficiently met, this will be a NoGo for the second stage.

---

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

---

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

---

1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

#### **Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model**

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals [1-3]. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points. The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

The primary result parameters of the experiment are:

-Infection persistence. It is obtained from the bioluminescence radiance obtained from the bacteria present at the consecutive days during a total experimental period of 28 days. Bioluminescence signals are related to signals from animals without injected bacteria.

-The other parameter indicating infection persistence is the amount of culturable bacteria after termination at day 28. It is the gold-standard of infection persistence and indicates whether or not the mice were able to eradicate the applied infection entirely after 28 days.

-Matrix metalloproteinase (MMP)-expression used as an inflammation marker. MMP-expression is measured by the fluorescence from activated fluorescence agents (MMP Sense, Perkin Elmer) after cleavage of its lysine-lysine bonds by active MMP-2, -3, -9 and -13. The amount of fluorescence is measured after injection

of the agent at day 7, 14 and 28.

- Increased vascularization and vascular permeability, used as additional inflammation markers. These markers are measured during the experimental time at day 7, 14 and 28, by applying an agent (AngioSense, Perkin Elmer) that accumulates from the blood stream in areas as a result of increased vascular permeability.

-Histology is used to study and visualize the distribution and amount of infiltrated inflammatory cells, also indicated by the amount and quality of fibrotic tissue formation.

---

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

Groups of five mice are housed in separate, ventilated cages with free access to water. In order to prevent feed-associated auto-fluorescence, the mice receive an alfalfa-free diet *ad libitum*.

Mice will be randomly assigned to five groups of 10 or 15 animals each (groups of 10 mice all receive a bacterial inoculum, additional groups of 5 mice receive no bacterial inoculum for the experimental composite mesh systems in the first stage – see also item E: herhaling en duplicering). During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub>. The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered once, as an analgesic directly before implantation.

Immediately after implantation (day 0), ten mice will receive an inoculum with  $5 \times 10^7$  CFU in 20  $\mu$ L saline alongside the biomaterial sample. Five mice from each group with degradable meshes (or without meshes) will not receive a bacterial inoculation. The relatively high inoculum of  $5 \times 10^7$  bacteria appeared an inoculum size leading to both culture positive peri-implant tissue biopsies and biomaterial implants in earlier BAI murine models.

For *in vivo* fluorescence imaging, mice under isoflurane/O<sub>2</sub> anesthesia are injected with 2 nmol of each fluorescent probe in a volume of 150  $\mu$ L for MMPsense®680 and 100  $\mu$ L for Angiosense750 preferably through tail-injection or retro-orbital vein injection depending on the preference of the available biotechnician at days 2, 6 and 13 post-implantation.

Bacterial clearance and inflammation will be evaluated using an In Vivo Imaging System (IVIS® Spectrum Perkin Elmer) on selected days over a period of up to 28 days at days 3, 7, 10, 14, 21 and 28. For imaging, mice are placed in the IVIS under 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub> anesthesia, with their back exposed to the camera. After acquiring a grey-scale photograph, a bioluminescence image is obtained (exposure time 1-5 min) using a 21x21 cm field of view and appropriate optical settings and filters. Images are automatically corrected for background noise. Regions of Interest (ROIs) of 5 cm<sup>2</sup> are manually created for each mouse and will be kept constant for all imaging sessions. Total photon counts over the ROIs are converted to photon fluxes (p/s) due to bioluminescence using *Living Image* software (Perkin Elmer).

The fluorescence fluxes generated from the MMP Sense and AngioSense probes will be quantified in the IVIS® system 24 h after their administration, i.e. at 7, 14 and 28 days post-implantation and in addition to the bioluminescence measurements. Twenty four hours are needed to allow the agents to be accumulated

in the inflamed zone and activated by the enzymatic action (in case of MMP's). Images are acquired using epi-illumination, with excitation/emission at 675/710 nm for MMPsense® 680, and 720/820 nm for Angiosense® 750. These filter combinations are chosen to avoid leakage of excitation light through the emission filter and optimize the ratio between fluorescence from the probe and auto-fluorescence from murine tissue. The emission spectrum of bacterial bioluminescence is located between 400 and 600 nm, with a maximum around 500 nm and is not interfering with the fluorescence spectra of the probes. Manually created ROIs are positioned to capture all the light from the entire spot created by fluorescence light, scattered by the skin. All ROIs are of equal size (5 cm<sup>2</sup>) and shape for each mouse and imaging session.

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

Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and assume that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.8) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively. In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials up to 5 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

60 Balb-C mice, both male and female, weighing 20-25 grams, typically relatively young (>8 weeks old).

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points, and there with a large reduction of animal numbers.

The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

Replacement is not an option for this experiment as this experiment represents the most complex setting of an implant in an infected environment. This setting cannot be reproduced in *in vitro* methods.

Further refinement is achieved by including the MMP and vascularization detection modes in the animal creating a longitudinal follow-up of wound healing and foreign body response, again without sacrifice in a longitudinal follow-up in single mice.

We have chosen mice for the extensive knowledge about and expertise with this species. The infection model is developing fast with little variability resulting in small experimental groups. The chosen experimental model with imaging techniques of both infection progression and inflammation development yields a lot of information and has been applied frequently. Therefore results can be interpreted by relating them to similar studies.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub>. The analgesic Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered before implantation.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

This has been checked on the basis of literature and reported developments in the field of mesh systems. The meshes going to be used are innovative mesh systems that received rigorous tests to assess elements of biocompatibility that can be investigated before going into animal trials. The non-composite meshes tested in the second stage are well-known and thoroughly tested mesh systems in infection-free animal models and patients. Therefore we skip the measurements without the presence of bacteria.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub> (Zeneca, Zoetermeer, The Netherlands). The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered subcutaneously once, as an analgesic during surgery.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incision and implantation of biomaterial	Discomfort when recovering from anesthesia: a few hours later low. At the start of the experiment, when mice are under anesthesia, Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered.
Injection of <i>S. aureus</i> inoculum	Discomfort will be experienced because of the course of infection. An infection with <i>S. aureus</i> may lead to a subcutaneous abscess, which probably resorbs after a small number of days. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion (4619k). Nevertheless, mice will be monitored on apathic and bad eating and drinking behavior and weight loss.
Anesthesia and Bio-optical imaging measurements	Anesthesia is given with 1.5 – 2% isoflurane during and shortly prior to imaging in order to avoid mouse movements during the exposure time of the camera. Stress will be experienced by animal handling and recovering from anesthesia, where repeated anesthesia can have a larger impact than incidental anesthesia.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

**See above**



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

**Infections:** No particular measures as they would bias the course of infection.

**Anesthesia and Bio-optical imaging Measurements:** The number of imaging sessions is limited to 7 in 28 days. For fluorescence imaging to 3 (imaging session will not need additional anesthesia episodes).

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If infections do increase beyond the implant site with systemic effects, as monitored by behaviour, apathy, fur, or substantial weight loss (>20%) the animals will be taken out of the experiment and euthanized during isoflurane anesthesia. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion.

Furthermore, the phenomenon of marsupialization may be encountered with subcutaneously implanted mesh discs where they protrude through the skin and then are rejected by the body. This protrusion is defined as a humane endpoint. The animals will be sacrificed upon detection of such an event, and the tissue with implant will still be examined with histology.

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

<5%

#### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Matig

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Histological evaluation

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie (doorbloeding) rondom bij nieuwe, deels degradeerbare chirurgische matjes
- 1.2 Looptijd van het project | 1 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Infectie, Imaging, Biomateriaal, Matje, Degradbaarheid, Biocompatibiliteit

## 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Vergeleken met niet-afbreekbare synthetische matjes laten biodegradeerbare chirurgische matjes van biologische oorsprong een verhoogde resistentie tegen bacteriële infectie zien, maar toch zijn de zogenoemde Biomateriaal Geassocieerde Infecties (BAI's) een ernstig probleem. Bovendien zijn biodegradeerbare matjes kostbaar en bieden ze soms ook te weinig mechanische sterkte om in alle gevallen van verhoogd infectierisico toegepast te kunnen worden.
- Volledig afbreekbare, biologische matjes kunnen mogelijk vervangen worden door matjes die wel voldoen aan de mechanische eisen. Die matjes hebben een gelaagde, deels biodegradeerbare sandwich-structuur. In het midden zit een niet-afbreekbaar, macroporeus matje van [REDACTED]. Dat wordt geflankeerd door een afbreekbaar matje aan de ene kant en een afbreekbare film aan de andere kant, beide [REDACTED].
- Het doel van de voorgenomen dierproeven is om dit matje te vergelijken met een gangbaar commercieel verkrijgbaar matje (Ethicon PHYSIOMESH™) en met twee niet-afbreekbare matjes van respectievelijk [REDACTED]. Het gaat daarbij om:
1. infectie-ontwikkeling en -persistentie rond het matje na enting met bacteriën ,
  2. ontwikkeling van een ontstekingsreactie (inflammatie),
  3. vascularisatie (vorming van nieuwe bloedvaten) rond het matje.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Wetenschappelijk**  
Om nieuwe antimicrobiële strategieën tegen Biomateriaal Geassocieerde Infecties (BAI's) te ontwikkelen, is een goed begrip vereist van de interactie tussen gastheer (het menselijk lichaam) en bacterie. Materiaalkeuze is essentieel, omdat de interactie van het immuunsysteem met het biomateriaal (de vreemdlichaamreactie) invloed heeft op de effectiviteit van het immuunsysteem als het gaat om het onderdrukken van BAI's. De wetenschappelijk hypothese is dat biodegradeerbare materialen het immuunsysteem minder ontregelen, waardoor bacteriële infecties sneller kunnen worden geklaard.
- Maatschappelijk**  
BAI's zijn nog steeds de belangrijkste reden voor het falen van een implantaat, terwijl het aantal patiënten dat een implantaat van biomateriaal krijgt elk jaar stijgt. De gevolgen van BAI's gaan gepaard met een langer verblijf in het ziekenhuis en hoge behandelingskosten. Vaak is een revisie-operatie nodig, soms overlijden patiënten als gevolg van de BAI. Met name bij mesh systemen (matjes) is het bestrijden van BAI's belangrijk omdat grote aantallen patiënten hiermee behandeld worden.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- 60 Balb/c OlaHsd immuun-competente muizen.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de
- Dieren ondervinden negatieve gevolgen voor hun welzijn door de aangebrachte infectie rond het geïmplanteerde matje en door

verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	de anesthesie die nodig is bij beeldvormende technieken. Niet-geïnfecteerde dieren ondervinden doorgaans weinig hinder van de geïmplanteerde matjes.
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Er is over het algemeen sprake van een matig ongerief als gevolg van de infectie en de korte anesthesie.
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na de laatste anesthesie en beeldvormingssessie komen de dieren niet meer bij en worden ze geëuthanaseerd. Weefsel rond het implantaat en het implantaat zelf worden uitgenomen voor histologisch onderzoek.

## 4 Drie V's

<p>4.1 <b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>	Het samenspel tussen de antimicrobiële werking van coatings en de immuunrespons van de gastheer ten opzichte van BAI's is niet <i>in vitro</i> na te bootsen. Vandaar dat het gebruik van diermodellen onmisbaar is.
<p>4.2 <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p>	Door het gebruik van bio-optische beeldvormingstechnieken, kunnen infectie en ontsteking gedurende de volledige experimentele tijd in één en dezelfde muis worden gevolgd. Dat betekent dat met een betrekkelijk gering aantal muizen een groot aantal metingen gedaan kan worden.
<p>4.3 <b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen</p>	Er wordt gekozen voor muizen vanwege de uitgebreide kennis over en expertise met dit dier. Het type infectiemodel waarvoor is gekozen, is relatief snel en heeft een beperkte variabiliteit (de persistentie van de doorgemaakte infectie varieert niet veel tussen de muizen onderling) wat betekent dat de groepsgrootte beperkt kan zijn.

[

diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Het gekozen diermodel, waarbij met beeldvormingstechnieken de doorgemaakte infectie en ontsteking in muizen kan worden gevolgd, levert veel informatie op en is vaak toegepast, waardoor de resultaten ook eenvoudig kunnen worden geïnterpreteerd en gerelateerd aan vergelijkbare onderzoeken.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Om stress tegen te gaan, worden de muizen in groepen gehuisvest en krijgen ze nestmateriaal (kooiverrijking). Ze worden met grote regelmaat geobserveerd, zodat pijn en ongerief in een vroeg stadium worden opgemerkt. Mocht er pijn optreden, dan krijgen ze pijnbestrijding. Persisteren de problemen dan worden de muizen geëuthanaseerd.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

# Format DEC-advies

---

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RuG code **8049**)
2. Titel van het project: **Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie (doorbloeding) rondom bij nieuwe, deels degradeerbare chirurgische matjes**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
  - mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC op: **10-02-2016**
  - aanvraag compleet: **10-02-2016**
  - in vergadering besproken op: **18-02-2016**
  - anderszins behandeld: **14-03-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot **23-02-2016 tot 08-03-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **08-03-2016**
  - advies aan CCD: **17-03-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum:
  - Plaats:
  - Aantal aanwezige DEC-leden:

- Aanwezig:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **23-02-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:
  - ***Vragen/opmerkingen t.a.v. project aanvraag***
  - Aangegeven wordt dat het onderzoek zowel fundamenteel als translationeel onderzoek is. Dit lijkt toch vooral translationeel onderzoek. Bent u het hiermee eens? Zo niet, waarom zou het tevens fundamenteel onderzoek zijn?
  - Referenties naar relevante literatuur en eigen voorwerk ontbreken volledig. Er wordt aangegeven dat het een 'established' diermodel betreft maar dit wordt nergens door gestaafd terwijl de onderzoekers er al eerder over gepubliceerd hebben (Daghighi et al., 2012, 2015). Kunt u relevante referenties aanbrengen?
  - Bij onderdeel 3.4.3. Om logistische redenen wordt het project opgedeeld in meerdere (2) groepen dieren die na elkaar door het protocol gaan. Echter, de onderzoeker wil de verschillende typen matjes naar type verdelen over de groepen. Er wordt geen duidelijke motivatie voor deze scheiding aangevoerd, bv : go-no go voor 2e groep o.b.v. resultaat 1e groep. Als die rationale er niet is zou het qua experimentele design beter zijn om de types 'netjes' te verdelen over de groepen.
  - ***T.a.v. de statistiek: Er zijn hier wat onduidelijkheden die hieronder verder worden uitgesplitst.***
  - Hoe wordt de statistiek gedaan? De zin 'If we consider each measuring point as an average over 10 mice' is wat verwarrend. Wat wordt hiermee bedoeld? Wordt hier een serie van T-tests uitgevoerd per tijdstip/meting, of wordt hier daadwerkelijk een gemiddelde berekend dat de input van het statistisch model is. De laatste zin doet vermoeden dat het niet om een berekend gemiddelde gaat, maar een test per tijdstip/meting. Graag bevestiging van de methode en als het kan de tekst iets duidelijker maken.
  - Als er inderdaad een serie van T-testen wordt uitgevoerd dan kan de laatste zin van de paragraaf 'It is reasonable to expect that if there are significant differences between either of the groups this will be detected in one or more of the 15 observation points.' voor problemen kan zorgen bij de beoordeling van de CCD. Als er afzonderlijke toetsen worden gedaan op herhaalde metingen dan zal hiervoor een correctie van de alpha moeten worden gedaan (multiple comparisons correctie). Met herhaalde metingen wordt b.v. bedoeld dat met de 7 bioluminescentie 'measuring points' per dier in principe steeds hetzelfde gemeten wordt. Met meervoudig testen neemt de onderzoeker kans op een type 1 fout (onterecht

verwerpen van de gekozen nul hypothese). Als het herhaalde metingen gedaan worden dan valt te overwegen om een repeated measures model hiervoor in de plaats te stellen (per outcome parameter: bioluminescentie etc). Een van de uitkomstmaten wordt dan het primaire eindpunt (waarop de sample size berekening gedaan wordt), de andere secundair. Herhaalde metingen binnen een model geven veel meer statistische power dan de afzonderlijke (gecorrigeerde) testen doordat een betere schatting gemaakt wordt van het gemiddelde binnen het dier, waardoor de spreiding tussen dieren afneemt.

- -De DEC vraagt zich af of het rekenvoorbeeld correct is. Er wordt gesteld dat gegeven de sample size een verschil kan worden gemeten in de orde van grootte van  $1.3 \times$  de standaard deviatie. Het verdere rekenvoorbeeld gaat echter uit van verschillen van  $1.3 \times$  het gemiddelde. Is het niet zo dat de bovengrens van het te detecteren verschil  $1.13$  zou zijn ( $10^5 + 1.3 \times 10^4$ )? Met dat verschil komt de DEC inderdaad in de orde van grootte van 9 tot 10 dieren.
- De rationale voor het niet meenemen van de niet met bacteriën geïnfecteerde controlegroepen voor de niet afbreekbare matjes ontbreekt.
- T.a.v. onderdeel D 'Vervanging, vermindering en verfijning': als verfijning wordt aangevoerd dat er 2 metingen (MMP-activiteit & vascularisatie) zijn toegevoegd, die ook als primaire doel/uitleesparameter zijn opgevoerd. Dit lijkt wat mager. In de NTS wordt veel meer verfijning opgevoerd, dit zou ook genoemd kunnen worden in het projectvoorstel.
- Het protocol beschrijft verschillende types analgesie voor dezelfde procedure (hoofdproject: buprenorfine, bijlage1 Rymadyl/carprofen). Mogelijk is buprenorfine geschikter hier omdat de read-outs infectie/inflammatie zijn en carprofen (is NSAID) anti-inflammatoire effecten heeft.
- Datum antwoord: **08-03-2016**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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



## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. **Ja**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **NVT**.

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en). **Ja**.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. **NVT**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, de inschatting is realistisch en goed geclassificeerd.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. De onderzoekers willen de interactie tussen het volledige en intacte immuunsysteem en implanteerbare biomaterialen onderzoeken. Dit kan niet anders dan in levende dieren.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren

lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja. Aan het vereiste van vermindering wordt door de onderzoekers tegemoetgekomen door: 1) gebruik van longitudinale in vivo imaging technieken om meerdere tijdstippen in hetzelfde dier te meten, 2) voor twee experimentele groepen hoeft een controle groep niet gemeten te worden omdat deze gegevens al in de literatuur beschikbaar zijn (voorkomen van onnodige duplicatie) en 3) De onderzoekers hebben een go/no go moment ingebouwd om onnodig gebruik van dieren in de 2<sup>e</sup> fase van de studie te voorkomen. Het maximale aantal te gebruiken dieren is gebaseerd op eigen eerder onderzoek en realistisch ingeschat.**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja. De onderzoekers kiezen voor een diermodel dat eerder gebruikt is en wat verregaand geoptimaliseerd is. Daarnaast is er oog voor optimale huisvesting en worden de dieren aansluitend aan de laatste scan getermineerd zonder bij te komen uit de anaesthesie. Dit alles draagt bij aan de verfijning van de proef.**

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

## **D. Ethische afweging**

**Implanteerbare chirurgische matjes van biomaterialen worden wereldwijd op grote schaal gebruikt in mensen, bijvoorbeeld bij de behandeling van abdominale hernia's. Een substantieel deel van de implantaties gaat gepaard met infectie, inflammatie en afstotingsreacties, die ernstige complicaties en vermindering van de kwaliteit van leven bij patiënten veroorzaken. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de (combinatie van) gebruikte biomaterialen van invloed is op het optreden van infectie en inflammatie.**

**In het hier voorgestelde translationele onderzoek willen onderzoekers matjes van een aantal materialen (gedeeltelijk afbreekbare), waaronder**

een recent ontwikkeld nieuw type, vergelijken m.b.t. het optreden van inflammatie en infectie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een bestaand diermodel gecombineerd met bestaande en nieuwe imaging technieken. De onderzoekers hebben een helder plan geformuleerd en besteden duidelijk aandacht aan de 3 V's.

Gezien de expertise en ervaring van de onderzoeksgroep met het gekozen diermodel, de gebruikte technieken en de gekozen termijn van 1 jaar is de kans op een succesvolle studie naar het oordeel van de DEC groot. De potentiële wetenschappelijke en maatschappelijke opbrengsten zijn goed omschreven en wegen naar het oordeel van de DEC op tegen het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016486

**Bijlagen**

2

Datum 21 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016486. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500

Naam instelling of organisatie: RUG

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 01179037

Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1,

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

IBAN: NL80ABNA0446049352

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2017  
Titel project: Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar infectie, ontsteking en vascularisatie rondom bij nieuwe deels degradeerbare chirurgische matjes  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Groningen





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016486

**Bijlagen**

2

Datum 21 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 21 maart 2016

Vervaldatum: 20 april 2016

Factuurnummer: 16700486

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016486	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016486

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 11 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Niet technische samenvatting**

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat onvoldoende informatie met betrekking tot de doelstelling. Daarnaast is de NTS te moeilijk beschreven, en moeilijk te begrijpen voor het brede publiek. Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

**Onduidelijkheden**

In uw projectaanvraag beschrijft u helder dat de dierproeven in 2 fasen zullen worden uitgevoerd. Dit komt niet duidelijk naar voren in de bijlage dierproeven. Daar lijkt het of alle 60 muizen tegelijk worden ingezet en is geen helder onderscheid tussen de 2 fasen. Wij verzoeken u deze informatie te verhelderen.

**Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Datum**

11 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002016486

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Onderwerp: antwoorden op vragen mbt aanvraag AVD105002016486

Hartelijk dank voor het commentaar op de aanvraag AVD105002016486

We hebben de NTS herschreven en daarbij meer informatie aangeleverd leidend tot de doelstelling. Ook is het taalgebruik verder vereenvoudigd. Daarbij hebben we gekeken hoe dit onderwerp op fora en websites met betrekking tot het gebruik van begrippen behandeld wordt.

Tevens is in de beschrijving dierproeven de fasering opgenomen zoals gevraagd, deze is in het rood weergegeven.

De NTS en de beschrijving dierproeven zijn bijgevoegd.

Met vriendelijke groet,

██████████



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	RUG				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model
Volgnummer	Type dierproef				
1	Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model				

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

#### **Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model**

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals [1-3]. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points. The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

The primary result parameters of the experiment are:

-Infection persistence. It is obtained from the bioluminescence radiance obtained from the bacteria present at the consecutive days during a total experimental period of 28 days. Bioluminescence signals are related to signals from animals without injected bacteria.

-The other parameter indicating infection persistence is the amount of culturable bacteria after termination at day 28. It is the gold-standard of infection persistence and indicates whether or not the mice were able to eradicate the applied infection entirely after 28 days.

-Matrix metalloproteinase (MMP)-expression used as an inflammation marker. MMP-expression is measured by the fluorescence from activated fluorescence agents (MMP Sense, Perkin Elmer) after cleavage of its lysine-lysine bonds by active MMP-2, -3, -9 and -13. The amount of fluorescence is measured after injection

of the agent at day 7, 14 and 28.

- Increased vascularization and vascular permeability, used as additional inflammation markers. These markers are measured during the experimental time at day 7, 14 and 28, by applying an agent (AngioSense, Perkin Elmer) that accumulates from the blood stream in areas as a result of increased vascular permeability.

-Histology is used to study and visualize the distribution and amount of infiltrated inflammatory cells, also indicated by the amount and quality of fibrotic tissue formation.

The project consists of two consecutive implantation and imaging periods in order to distribute workload, especially with regard to the frequent imaging sessions.

The first implantation series will involve the animal groups receiving the composite meshes and sham implantation (three animal groups with 40 animals).

The second implantation series involves the two animal groups (20 animals) receiving the non-composite PTFE and PP meshes.

The results obtained in the first stage will be evaluated against **the expectations**. If the expectations are not sufficiently met, this will be a NoGo for the second implantation series. The expectation is that the composite mesh will outperform the control device in the infected environment because of better tissue integration and faster blood vessel formation as a result of the special designed bioabsorbable materials. The second phase will compare the permanent components of the same devices, which is intended to understand the device performance after bioabsorbable materials are fully degraded.

[REDACTED]

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

Groups of five mice are housed in separate, ventilated cages with free access to water. In order to prevent feed-associated auto-fluorescence, the mice receive an alfalfa-free diet *ad libitum*.

Mice will be randomly assigned to five groups of 10 or 15 animals each.

In the first stage two groups of 15 mice will receive composite meshes, of these 15 mice in each of the two groups, 10 mice will receive a bacterial inoculum, and 5 mice will not be inoculated. The third group consists of 10 mice that all will receive the sham operation, which consists of the full surgical procedure without the implantation of mesh systems. Five of the mice additionally receive the bacterial inoculum, whereas the other 5 do not receive the bacterial inoculum. In stage I a total of 40 mice will be used.

In the second stage two more groups will be implanted with the non-composite meshes PTFE and PP. Each group contains 10 mice that all will additionally be inoculated with bacteria. In stage II a total of 20 mice will be used. The use of non-infected animals in this second stage is not necessary because of ample knowledge about the behavior of these mesh systems in non-infected animal models. Furthermore, the data obtained can directly be compared with the data obtained with the composite mesh systems in our study (stage I).

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub>. The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered once, as an analgesic directly before implantation.

Immediately after implantation (day 0), ten mice will receive an inoculum with  $5 \times 10^7$  CFU in 20  $\mu$ L saline alongside the biomaterial sample. Five mice from each group with degradable meshes (or without meshes) will not receive a bacterial inoculation. The relatively high inoculum of  $5 \times 10^7$  bacteria appeared an inoculum size leading to both culture positive peri-implant tissue biopsies and biomaterial implants in earlier BAI murine models.

For *in vivo* fluorescence imaging, mice under isoflurane/O<sub>2</sub> anesthesia are injected with 2 nmol of each fluorescent probe in a volume of 150  $\mu$ L for MMPsense®680 and 100  $\mu$ L for Angiosense750 preferably through tail-injection or retro-orbital vein injection depending on the preference of the available biotechnician at days 2, 6 and 13 post-implantation.

Bacterial clearance and inflammation will be evaluated using an In Vivo Imaging System (IVIS® Spectrum Perkin Elmer) on selected days over a period of up to 28 days at days 3, 7, 10, 14, 21 and 28. For imaging, mice are placed in the IVIS under 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub> anesthesia, with their back exposed to the camera. After acquiring a grey-scale photograph, a bioluminescence image is obtained (exposure time 1-5 min) using a 21x21 cm field of view and appropriate optical settings and filters. Images are automatically corrected for background noise. Regions of Interest (ROIs) of 5 cm<sup>2</sup> are manually created for each mouse and will be kept constant for all imaging sessions. Total photon counts over the ROIs are converted to photon fluxes (p/s) due to bioluminescence using *Living Image* software (Perkin Elmer).

The fluorescence fluxes generated from the MMP Sense and AngioSense probes will be quantified in the IVIS® system 24 h after their administration, i.e. at 7, 14 and 28 days post-implantation and in addition to the bioluminescence measurements. Twenty four hours are needed to allow the agents to be accumulated in the inflamed zone and activated by the enzymatic action (in case of MMP's). Images are acquired using epi-illumination, with excitation/emission at 675/710 nm for MMPsense®680, and 720/820 nm for Angiosense®750. These filter combinations are chosen to avoid leakage of excitation light through the emission filter and optimize the ratio between fluorescence from the probe and auto-fluorescence from murine tissue. The emission spectrum of bacterial bioluminescence is located between 400 and 600 nm, with a maximum around 500 nm and is not interfering with the fluorescence spectra of the probes. Manually created ROIs are positioned to capture all the light from the entire spot created by fluorescence light, scattered by the skin. All ROIs are of equal size (5 cm<sup>2</sup>) and shape for each mouse and imaging session.

---

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

Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and take into consideration that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.9) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively. In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials between 2 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power. **Non-infected groups are smaller (5 mice) because the variation in these mice, not suffering from an infection, are far smaller.**







---

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

60 Balb-C mice, both male and female, weighing 20-25 grams, typically relatively young (>8 weeks old).

---

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

The experimental approach is based on an established animal model involving bio-optical *in vivo* imaging in which the amount of information gained is reached with a relatively small amount of animals. As an advantage, bio-optical imaging enables longitudinal monitoring of infection and inflammation persistence in single and the same animals without sacrifice, which is an enormous statistical advantage over the use of multiple groups of animals for analyses at different time points, and there with a large reduction of animal numbers.

The technique thus allows statistically significant conclusions to be drawn with relatively low numbers of animals. It also meets ethical considerations and the ensuing societal pressure to reduce the number of animals used in scientific experiments.

Replacement is not an option for this experiment as this experiment represents the most complex setting of an implant in an infected environment. This setting cannot be reproduced in *in vitro* methods.

Further refinement is achieved by including the MMP and vascularization detection modes in the animal creating a longitudinal follow-up of wound healing and foreign body response, again without sacrifice in a longitudinal follow-up in single mice.

We have chosen mice for the extensive knowledge about and expertise with this species. The infection model is developing fast with little variability resulting in small experimental groups. The chosen experimental model with imaging techniques of both infection progression and inflammation development yields a lot of information and has been applied frequently. Therefore results can be interpreted by relating them to similar studies.

---

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub>. The analgesic Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered before implantation.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

This has been checked on the basis of literature and reported developments in the field of mesh systems. The meshes going to be used are innovative mesh systems that received rigorous tests to assess elements of biocompatibility that can be investigated before going into animal trials. The non-composite meshes tested in the second stage are well-known and thoroughly tested mesh systems in infection-free animal models and patients. Therefore we skip the measurements without the presence of bacteria.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

During surgery, mice are placed on a heating mat and anesthesia is induced with 3.5%, and maintained at 1.5% isoflurane/O<sub>2</sub> (Zeneca, Zoetermeer, The Netherlands). The dorsal side of the mice is shaved in order to prevent bioluminescent light scattering and the skin is disinfected with 70% ethanol to reduce the surgical site infections. Sterile mesh samples will be implanted in pockets created subcutaneously and

positioned far enough from the incision to prevent interference with inflammation around the incision area. Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered subcutaneously once, as an analgesic during surgery.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Incision and implantation of biomaterial	Discomfort when recovering from anesthesia: a few hours later low. At the start of the experiment, when mice are under anesthesia, Buprenorphin (0.05 mg/kg) will be administered.
Injection of <i>S. aureus</i> inoculum	Discomfort will be experienced because of the course of infection. An infection with <i>S. aureus</i> may lead to a subcutaneous abscess, which probably resorbs after a small number of days. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion. Nevertheless, mice will be monitored on apathic and bad eating and drinking behavior and weight loss.
Anesthesia and Bio-optical imaging measurements	Anesthesia is given with 1.5 – 2% isoflurane during and shortly prior to imaging in order to avoid mouse movements during the exposure time of the camera. Stress will be experienced by animal handling and recovering from anesthesia, where repeated anesthesia can have a larger impact than incidental anesthesia.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

See above

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

**Infections:** No particular measures as they would bias the course of infection.

**Anesthesia and Bio-optical imaging Measurements:** The number of imaging sessions is limited to 7 in 28 days. For fluorescence imaging to 3 (imaging session will not need additional anesthesia episodes).

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If infections do increase beyond the implant site with systemic effects, as monitored by behaviour, apathy, fur, or substantial weight loss (>20%) the animals will be taken out of the experiment and euthanized during isoflurane anesthesia. Only in rare occasions sepsis and organ failure may occur. In the recent studies on BAI this scenario took place in only one occasion.

Furthermore, the phenomenon of marsupialization may be encountered with subcutaneously implanted mesh discs where they protrude through the skin and then are rejected by the body. This protrusion is defined as a humane endpoint. The animals will be sacrificed upon detection of such an event, and the tissue with implant will still be examined with histology.

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

<5%

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Matig

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Histological evaluation

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 5 april 2016 15:27  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD105002016486

**Categorieën:** [REDACTED]

Beste [REDACTED]

De DEC heeft de aanvraag anders gelezen dan de CCD met betrekking tot eerder verkregen resultaten. De onderzoeker stelt dat in eerder onderzoek verschillen tot maximaal 5-10 maal de standaard deviatie zijn gevonden. De DEC heeft dit gelezen als de bovengrens van de 'effect size' die in onderzoek met een vergelijkbare opzet is gevonden. Het maximaal te verwachten effect op basis van eerder onderzoek ligt dus in de orde van 5-10 x de standaarddeviatie. Echter, dit zegt niets over hoe klein de 'effect size' kan zijn, of bijvoorbeeld mag zijn, om voor de onderzoeker relevant te zijn in deze studie. En het is met name deze ondergrens die kritiek is voor het bepalen van de sample size. Elk nieuw onderzoek zal veranderingen met zich meebrengen die er voor kunnen zorgen dat de grootte van de verschillen substantieel kleiner zijn dan die gevonden in eerdere studies (gebruik van andere materialen, etc). De door de onderzoeker gebruikte sample size berekening was voor de DEC de ondergrens (1.3 x de standaard deviatie) en uitdrukking van dit effect. Met andere woorden, de verwachtte verschillen liggen tussen de 1.3 en 10 maal de standaarddeviatie. Daarom acht de DEC het niet realistisch is om een grens van 5x de standaard deviatie als ondergrens te gebruiken. Hiermee loop je, naar oordeel van de DEC, een substantieel risico om een studie te krijgen met te weinig power, hetgeen niet overeen komt met het streven naar reductie.

Met vriendelijke groet, namens de DEC-RUG

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** donderdag 31 maart 2016 15:49  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** Aanvullende informatie aanvraag AVD105002016486

Beste DEC RUG,  
 Enige tijd geleden heeft u ons een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD105002016486 getiteld: "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model"  
 Onze dank voor dit advies. Wij hebben nog 1 vraag over deze aanvraag.

In uw DEC advies beschrijft u dat u de aanvrager om verduidelijking heeft gevraagd betreffende de powerberekening. In de aanvraag zoals die nu bij ons voorligt schrijft de aanvrager:  
 Group sizes are decided to include 10 mice with similar mesh implants and treatments for infection and inflammation analysis and mesh comparison. This number of mice per group is analogous to group sizes mentioned in a number of scientific papers describing similar animal models [1-3]. If we consider groups of 10 mice and assume that bioluminescence- or fluorescence values for each single measuring point (at a specific day) are normally distributed within a group, with a standard deviation of 0.1, we would be able to measure significant differences between two groups (Alpha=0.05 and Power=0.8) if the difference is larger or equal to around 1.3 times the size of a standard deviation. For a power of 0.9 we are able to discriminate differences larger or equal to around 1.6 times the standard deviation, respectively.

Wij begrijpen dat bij een n van 10 muizen per groep een verschil tussen groepen van 1.3 x de standaarddeviatie kan worden opgepikt. Daarna schrijft de onderzoeker echter: "In previous research we found differences in bioluminescence and fluorescence between various materials up to 5 to 10 times the standard deviation at several points in time [1-3]. So we believe that group sizes of 10 mice are realistic and deliver sufficient statistical power."  
 Dit impliceert dat het aantal van 10 muizen per groep in ieder geval voldoende is. De vraag die nu bij ons rijst is of dit aantal van 10 dieren per groep niet te groot is. Als een verschil van minimaal 5x de standaarddeviatie wordt

verwacht (waarom zou dit anders zijn dan in voorgaande studies), zou dan toch met veel minder dieren per groep kunnen worden volstaan?

Wat is de mening van DEC RuG hierover? Kunt u dit toelichten?

Graag ontvangen wij een reactie op deze vraag uiterlijk 5 april 2016 voor 16.00 uur, zodat wij indien nodig de aanvrager dezelfde vraag nog kunnen voorleggen.

Met vriendelijke groet,

  
Centrale Commissie Dierproeven

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

RUG

A. Deusinglaan 1,  
9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016486  
**Bijlagen**  
1

Datum 2 mei 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 18 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de NTS aangepast op inhoud en begrijpelijker taalgebruik. Daarnaast heeft u op ons verzoek fasering in bijlage 1 beschreven.

### **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. De algemene voorwaarde betreffende het afstemmen van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in dierproeven te voorkomen.

U kunt met uw project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 mei 2016 tot en met 1 april 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2016. 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 5 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Deze aanvulling betrof een nadere uitleg over de mening van de DEC over de statistische onderbouwing van de groeps grootte in de experimenten. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie, inclusief de aanvulling op het advies. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er wordt wel een algemene voorwaarde gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven



#### **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: RUG  
Adres: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 mei 2016 tot en met 1 april 2017, voor het project "Assessment of infection, inflammation and vascularization around implanted novel, partly degradable surgical meshes for abdominal hernia repair in a murine model" met aanvraagnummer AVD105002016486, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2016, ontvangen op 18 maart 2016; aanvullend advies ontvangen op 5 april 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 april 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Implantation of surgical meshes: Assessment of infection, inflammation and vascularization in a murine model	Muizen (Mus musculus)	60	100% Matig	

### Voorwaarden

#### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

# 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 kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

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

Uit artikel 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.