

<b>Inventaris Wob-verzoek W23-03</b>		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>				
<b>nr.</b>	<b>document NTS 20209667</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>5.1, lid 1c</b>	<b>5.1, lid 2e</b>	<b>5.1, lid 2f</b>	<b>5.1, lid 2h</b>	<b>5.2, lid 1</b>
1	Aanvraag projectvergunning (met natte handtekening), d.d. 9-4-2020				x		x		x	
2	Aanvraag projectvergunning, d.d. 9-4-2020				x		x		x	
3	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
4	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
5	NTS bij de aanvraag			x						
6	E-mail CCD aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 14-04-2020				x				x	
7	Reactie DEC				x				x	
8	E-mail CCD aan vergunninghouder over niet-toetsbare aanvraag, d.d. 26-5-2020				x		x		x	
9	Antwoorden op vragen			x						
10	Projectvoorstel na niet toetsbare aanvraag				x				x	
11	Bijlage dierproeven na niet toetsbare aanvraag				x				x	
12	NTS na niet toetsbare aanvraag			x						
13	E-mail CCD aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 02-06-2020				x				x	
14	DEC advies, d.d. 10-07-2020				x				x	
15	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
16	Bijlage dierproeven na DEC advies								x	
17	NTS na DEC advies			x						
18	AdviesNotaCCD, d.d. 24-07-2020 met opmerkingen				x		x		x	x
19	AdviesNotaCCD, d.d. 31-07-2020				x		x		x	x
20	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag, d.d. 10-08-2020				x		x		x	
21	NTS na CCD vragen en definitieve versie			x						
22	AdviesNotaCCD, d.d. 24-08-2020				x		x		x	x
23	Beschikking, d.d. 24-08-2020				x		x		x	
24	E-mail CCD aan DEC over aanvraag projectvergunning, d.d. 24-8-2020						x		x	



9667

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

23 OKT 2020

- 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 <span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2h</span> <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2h</span>
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
		KvK-nummer	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2h</span>
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postbus	
		Postcode en plaats	
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span> x Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
		Afdeling	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2h</span>
		Telefoonnummer	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
		E-mailadres	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span> X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
		Afdeling	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2h</span>
		Telefoonnummer	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>
		E-mailadres	<span style="background-color: #cccccc; padding: 2px;">5.1 lid2e</span>

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters |  | <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 | 01-08-2020 |
| Einddatum  | 31-07-2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |           |
|-------------|-----------|
| Naam DEC    | 5.1 lid2h |
| Postadres   |           |
| E-mailadres | 5.1 lid2e |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1389 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.*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van 5.1 lid2h dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van tevoren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: 5.1 lid2h

Factuur e-mailadres: 5.1 lid2e

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en te versturen naar het factuur mailadres.

## 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 5.1 lid2e

Functie 5.1 lid2e

Plaats 5.1 lid2h

Datum 09 - 04 - 2020

Handtekening

15-10-2020

5.1 lid2e



## 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?

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

- Ja > Vul uw deelnemernummer in [5.1 lid2h](#)
- Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie [5.1 lid2h](#)

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [5.1 lid2e](#)

KvK-nummer [5.1 lid2h](#)

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Straat en huisnummer [5.1 lid2h](#)

Postbus [5.1 lid2h](#)

Postcode en plaats [5.1 lid2h](#)

IBAN

Tenaamstelling van het rekeningnummer

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [5.1 lid2e](#) x Dhr.  Mw.

Functie [5.1 lid2e](#)

Afdeling [5.1 lid2h](#)

Telefoonnummer [5.1 lid2e](#)

E-mailadres [5.1 lid2e](#)

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

(Titel) Naam en voorletters [5.1 lid2e](#) X Dhr.  Mw.

Functie [5.1 lid2e](#)

Afdeling [5.1 lid2h](#)

Telefoonnummer [5.1 lid2e](#)

E-mailadres [5.1 lid2e](#)



- 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 | 01-08-2020 |
| Einddatum  | 31-07-2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |           |
|-------------|-----------|
| Naam DEC    | 5.1 lid2h |
| Postadres   |           |
| E-mailadres |           |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1389 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\*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de **5.1 lid2h** dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: **5.1 lid2h**

Factuur e-mailadres: **5.1 lid2e**

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en te versturen naar het factuur mailadres.

## 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 **5.1 lid2e**

Functie **5.1 lid2e**

Plaats **5.1 lid2h**

Datum 09 - 04 - 2020

Handtekening

**5.1 lid2e**



## Form

### Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Evaluation of artemisinin on the addictive properties of addiction nicotine and opioids

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Addiction is a chronically relapsing condition that exerts a significant personal and financial cost to society. One of the most commonly abused *legal* drugs, nicotine, is responsible for a significant



proportion of this cost to society with yearly 20,000 deaths in the Netherlands. Another major concern in addiction care is the recent opioid crisis in the United States (US). Although non-medical opioid use has been declining, medical prescription of opioid-painkillers poses a major threat to health. In 2017, more than 70,000 people died from drug overdoses, making it a leading cause of injury-related death in the US. Of those deaths, almost 68% involved a prescription or illicit opioid. Therefore, opioid and tobacco use disorder are significant risk factors for premature death and disabilities.

Although the choice to try a drug for the first time is voluntary, it can be influenced by external factors such as peer pressure, price, and, in particular, availability. Nonetheless, most people exposed to drugs do not develop addiction. At some point after continued repetition of voluntary use, the ability to control its use is lost in a subset of people. At that point, there is a compulsive, often overwhelming involuntary aspect to continue nicotine and opioid use. Most importantly, short term (weeks to months) control over nicotine and opioids appears to be possible, but given enough time relapse invariably occurs after a period of abstinence.

Recent advances in our understanding of brain function have led to the conclusion that addiction is a biological disorder, in the same manner as other psychopathologies (Dackis & O'Brien, 2005, *Nat Neurosci.*). Just as a patient suffering from depression should not be told "snap out of it, just be happy", a patient suffering from substance use disorders cannot just "choose to stop taking drugs". Instead, the patient is in need of help and proper treatment to remain abstinent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5) lists several criteria for a diagnosis of 'substance use disorder'. Whilst there are various factors which can lead to presentation with these symptoms, the key impediment to treatment is relapse. Relapse is a seemingly inevitable outcome, despite stated intentions to remain abstinent. What then, are the causes of relapse? Learned associations play an important role in nicotine and opioid addiction. With repeated drug use, the effects become associated with stimuli or cues in the environment, such as packaging, contexts, and people (Wikler, 1973, *Arch. Gen. Psychiatry*). These memories are notoriously difficult to remove, and they persist during abstinence long after cessation of opioid or nicotine use. Cues that are associated with opioids and nicotine are a key trigger for relapse, and thus critical for maintaining the cycle of opioid and nicotine addiction (Siegel, 1999, *Addiction*). Drug cues can be classified as discrete or contextual. Discrete cues are objects or sensory stimuli that are directly paired with the consumption of the drug, also referred to as drug paraphernalia. Contextual cues refer to the environment/context in which drug consumption takes place. Another factor that can trigger a relapse in abstinent drug users is re-exposure to the drug itself. A small amount of the drug taken after prolonged abstinence often causes strong craving and a so-called drug-induced relapse. There is considerable evidence that the effects of drug priming, discrete and contextual cues on drug seeking are mediated by partly distinct neural substrates (Bossert et al, 2013, *Psychopharmacology*). Treatment strategies for addiction focus on prevention of relapse, but to date these medications have limited efficacy. In this project we propose to evaluate the effects of a medication (that is used worldwide as a treatment for malaria and also as an anti-cancer drug) on the addictive properties of nicotine and opioids. We believe this drug has potential anti-addiction properties based on its actions on GABA receptors. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the CNS and exerts its effects through activation of GABA-A and GABA-B receptors. There are several lines of evidence showing that GABA signalling and in particular through the GABA-A receptor (GABAAR) is disturbed in addiction. Our own research has shown, using a rat model of nicotine addiction, that exposure to nicotine-associated cues (evoking relapse behaviour) resulted in a rapid increase in the availability of GABA-A receptors in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). Manipulation of the trafficking of these GABA-A receptors revealed that GABA-A receptors mediate an inhibitory effect on nicotine relapse and that further activation of GABA-A receptors in the dmPFC with the GABA-A receptor agonist muscimol strongly reduced the propensity to relapse upon exposure to nicotine cues. These results are in line with observations from human imaging studies that metabolic activity in the anterior cingulate cortex (ACC, the human equivalent of the dmPFC in rats) is strongly correlated with craving in human addicts (Volkow and Baler, 2014, *Neuropharmacology*) and studies showing reduced levels of GABA in the ACC of addicted subjects (Prescott et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*; Abé et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*) Variations in GABAAR also play a significant role in impulsivity traits that are related to drug abuse (Stephens et al, 2017, *Genes, Brain Behav.*). In humans the GABAAR gene subtype has been linked to a

variety of clinical disorders characterized by a lack of impulse control and pharmacological activation of GABAAR reverses increased impulsivity and high alcohol consumption in rats (Gondré-Lewis et al, 2016, Stress). Finally, the neurotransmitter dopamine (DA), a critical moderator of addiction behaviour has recently been shown to act as a direct modulator of GABAAR, in particular of GABAA receptors carrying the  $\beta 3$  subunit (Hoerbelt et al, 2015, J Neurosci.). It has been postulated that high concentrations of DA (resulting from drug exposure) may result in a disrupted DA-GABA relationship in the brain. All these lines of evidence lead to the hypothesis that enhancing GABA-A transmission may have therapeutic value in the treatment of drug addiction.

There are several registered medications that enhance GABAAR-signalling, such as very recently shown for the natural occurring anti-malarial drug artemisinin (Klayman, 1985, Science). Artemisinin not only (a) enhances GABAAR signalling (Berishvili, 2017, Cell); (b) but also affects the GABAAR $\beta 3$ -subunit (its effects on GABAAR signalling are counteracted by the  $\beta 3$ -GABAAR antagonist picrotoxin (Berishvili, 2017, Cell); (c) and has antinociceptive effects. The antinociceptive (pain-killing) effects of artemisinin are also mediated by activation of GABAAR (Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). This is of particular interest as the antinociceptive and reinforcing effects of opioids are also mediated through GABA neurotransmission. As such, artemisinin may directly interfere with the effects of opioids.

Importantly, artemisinin at clinically relevant doses is in general well tolerated with mild adverse reactions such as nausea, reduced appetite, vomiting in >10% of humans (Klayman, 1985, Science), also within its application in oncology (Slezakova and Ruda-Kucerova, 2017, Anticancer Res.). This is in contrast to most GABAAR agonists, including benzodiazepines, which have limited clinical utility because of sedative side-effects, dependence, tolerance and withdrawal (Fischer, 2017, CNS & Neurological Disorders).

Therefore, we postulate that artemisinin is a relatively safe and promising candidate for the treatment of opioid and nicotine addiction.

We have chosen to focus on both nicotine and opioids use in the same project. There is increasing evidence in the literature that different drugs of abuse act on different neurobiological mechanisms. Therefore, in this project we will use the same pharmacological approaches to study addiction to two different drugs of abuse. This will allow us to identify similarities and differences in the neurobiological substrates of addiction to these two drugs. Based on the literature and our own studies we speculate that artemisinin will reduce the reinforcing value of opioids and reduce cue-induced relapse to these drugs. We will use heroin as the opioid of choice in our experiments as we have ample experience with this drug in our animal models. It is important to note that opioids like heroin and the medically approved morphine, fentanyl and oxycodone, all exert their primary action through activation of the same mu-opioid receptor.

### 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 **main objective** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin-self-administration and relapse.

Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.

2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?
3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?

This would be the first study to evaluate artemisinin as a potential anti-addiction treatment. Given the strong predictive value of our models, positive results would be a major first step in the development of novel pharmacotherapies to treat tobacco and (prescription) opioid addiction and potentially other addictions.

We have budgeted 5 years for this project because each of the behavioral experiments takes approx. 3 months to complete. We have strong experience in the operation of behavioral experiments looking at self-administration and relapse. Furthermore, we have experience using the proposed methodology for intracranial infusions of drugs that are crucial to increase our understanding of the neural mechanisms and substrates of relapse.

Our facility has an adequate number of operant chambers, housing facilities, and full-time staff to complete all of these experiments within the 5-year time-frame of the protocol. Furthermore, all of the equipment is already present.

---

### 3.3 Relevance

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

In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the neurobiology of nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in addictive behaviour and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse mechanisms. These experiments will generate novel findings about the neural circuitry of motivated behaviours, and such findings are of interest in the neuroscience field more generally.

In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world ([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf)). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017. Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. A great advantage is that it concerns an already registered medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. This could strongly reduce the time and effort needed for implementation in human treatment protocols. Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with these collaborators.

---

### 3.4 Research strategy

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

The **overarching aim** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.

We are using well validated animal models of i.v. self-administration and relapse. These models allow us to evaluate effects of artemisinin on (a) the reinforcing properties of heroin and nicotine, (b) on the motivational properties of both drugs (using progressive ratio schedules of reinforcement) and (c) on cue-, context- and drug-induced relapse.

---

Although our main focus is on relapse prevention, it is important to also evaluate artemisinin effects on other behavioural readouts (reinforcement, motivation) to obtain a full picture of the potential therapeutic value of this compound and the underlying mechanisms.

#### First series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse. Doses of artemisinin will be based on recent literature showing antinociceptive effects in a dose range of 2.5 – 10 mg/kg following i.p. administration. These effects were blocked by a GABA-R antagonist, providing evidence that they were mediated through activation of GABA-A receptors. Therefore, we will use a similar dose range in our experiments. We will use a between-subject design (3 groups) to study the effects of 0, 3 and 10 mg/kg i.p. of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse to opioid and nicotine seeking in 4 separate experiments.

#### Second series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on the reinforcing and motivational properties of heroin and nicotine.

In case of nicotine; experiments will only be performed if the first series of experiments show a reduction in either cue-, context- or drug-induced relapse.

In case of heroin given the fact that both artemisinin and opioids exert their effects directly or indirectly through GABA-A signalling, we speculate that the reinforcing effects of heroin will be affected by artemisinin. Therefore, regardless of the outcome of the relapse studies (that are performed under heroin-free conditions), we will conduct these experiments.

We will use a within-subject design to test 3 doses of artemisinin on heroin (or nicotine) self-administration under a fixed ratio schedule of reinforcement and under a progressive ratio schedule of reinforcement. The latter schedule is designed to measure the motivational properties of drugs.

#### Third series of experiments:

If positive effects on relapse are observed in our first series of experiments, we will here evaluate artemisinin in a more clinically relevant dose regimen (go/no go moment). In clinical settings medical treatment usually occurs with chronic treatment protocols where medication is taken for several weeks or months. In order to evaluate whether prolonged treatment with artemisinin will reduce the propensity to relapse, animals will receive daily injections of artemisinin during the 3 weeks abstinence phase of the self-administration – relapse protocol. We will use a between subject design with 2 groups. The dose of artemisinin will be based on the outcome of the first series of experiments.

#### Fourth series of experiments:

In a final set of experiments, we will test our hypothesis that the relapse-attenuating effects of artemisinin are mediated in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). To that end, animals will be implanted with guide cannula directed at the dmPFC, allowing intracranial infusion of artemisinin prior to the relapse test. These experiments will only be performed after a positive result on relapse in the first series of experiments (go/no go moment).

---

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.

---

#### Surgeries:

All rats will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

#### Artemisinin treatment:

In the first series of experiment we will evaluate the acute effects of artemisinin on relapse behaviour. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per relapse test and each rat will be tested twice. In second series we will evaluate the acute effects of artemisinin on the reinforcing and

---

motivational properties of heroin and nicotine. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per test and each rat will be tested 6 times. In the third series of experiments we will evaluate the chronic effects of artemisinin on relapse. Rats will be injected daily with artemisinin or vehicle for 20 days. In the fourth series of experiments we will evaluate the acute intracranial (dmPFC) effects of artemisinin on relapse. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 µg) per relapse test and each rat will be tested twice.

#### Behavioural task:

The self-administration - relapse model consists of a **self-administration phase** during which responding on a lever results in the i.v. infusion of a drug (heroin or nicotine).

In a cue-induced relapse experiment a 5 second tone/light stimulus (discrete cue) is presented during the infusion. In some experiments, animals will be subjected to a progressive ratio schedule of reinforcement, tailored to measure the motivational properties of the drug. During a progressive ratio schedule, the number of lever presses needed to obtain an infusion of the drug will be progressively increased until a so-called breakpoint is reached. The self-administration phase is followed by an **extinction phase** during which responding for the drug will be extinguished. During this phase, lever presses do not result in drug delivery and presentation of the discrete cues. Subsequently, a relapse is provoked by re-introducing the discrete cues and the ability to respond for these cues. No drug is delivered during the relapse test. After the **cue-induced relapse test**, the discrete cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test. Previous work has indicated that drug-induced relapse is more robust in the presence of previously extinguished drug-associated cues.

In **context-induced relapse experiments**, rats will be randomly assigned to one of two different contexts. These contexts differ in **auditory** (white noise (70 dB), either continuous or interval (5 s on, 5 s off)), **olfactory** (either lemon-scented or almond-scented odour) and **tactile** cues (chamber floor: a flat PVC surface with either holes or straight grooves). The extinction phase takes place in the other context. During daily sessions in a distinct context and without drug delivery responding for the drug will be extinguished. Context-induced relapse is then tested by placing the rats again in the drug-associated (training) context with no drug delivery. After the context-induced relapse test, the drug cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test.

We will evaluate the effects of artemisinin on the different parameters of the behavioural task: on drug self-administration, progressive ratio responding and cue-, context- and drug-induced relapse.

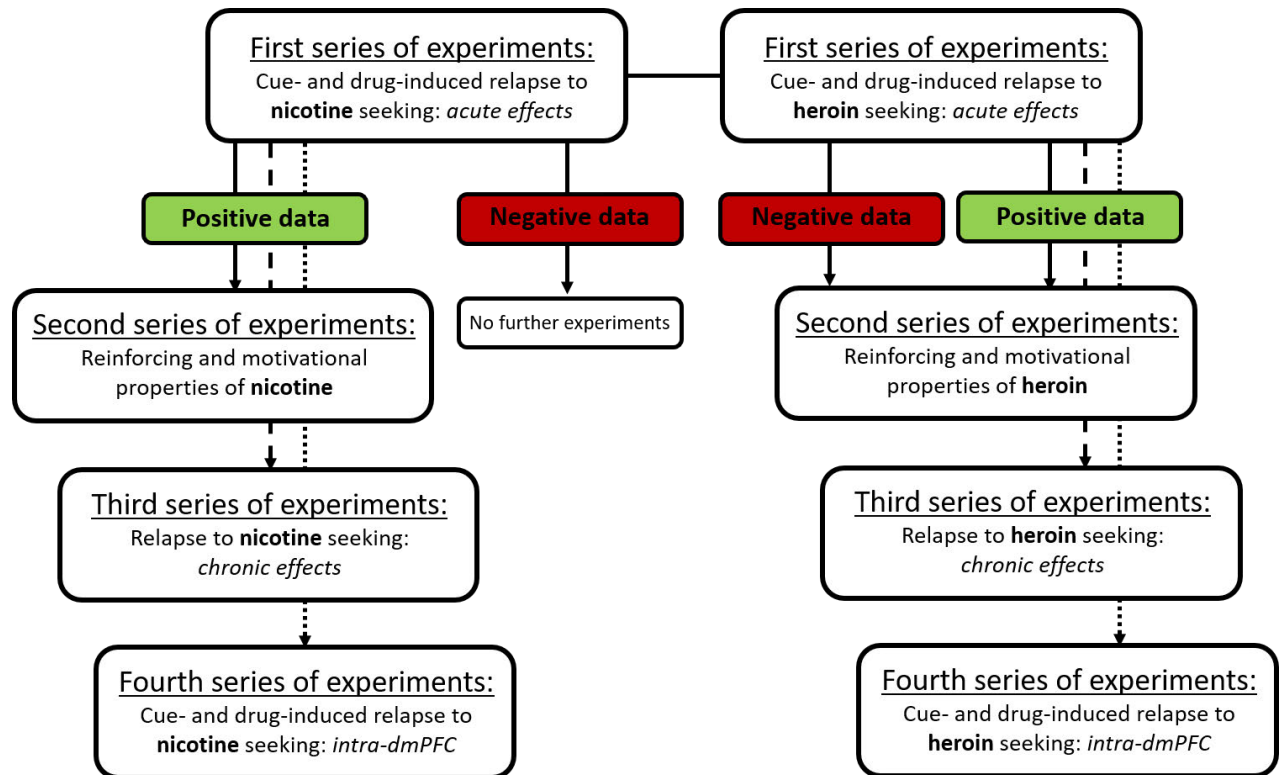
---

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

The study as a whole is designed to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse. For each series of experiments, there are specific decision points that will guide future experiments.

---





Outline of decision points where rats will be used or not depending on the outcome of experiments.

The first series of experiments focus on the acute effects of artemisinin on cue- (discrete and context) and drug-induced relapse of nicotine and heroin seeking. Based on our previous work and that by others we hypothesize that artemisinin will be effective in reducing relapse to nicotine. If so, we will continue with the second, third and fourth series of experiments. If not, no further experiments with nicotine will be performed. In parallel, we will investigate the acute effects of artemisinin on relapse to heroin seeking. Again, positive effects will lead to the second, third and fourth series of experiments. If the first series of experiments with heroin yield negative results, we will still conduct the second series of experiments with heroin. This is because GABA-AR activation by artemisinin may directly interfere with the reinforcing effects of heroin. However, third and fourth series of experiments with heroin will not be performed in that case.

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	Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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.

**Behavioral approach:** We use a rat self-administration-relapse model to study the modulatory role of Artemisinin on heroin and nicotine self-administration and cue-, context-, and drug-induced relapse.

##### Description of the general design for behavioural training:

Separate groups of adult male and female rats will be trained to self-administer nicotine or heroin in the presence of a discrete compound (tone + light) cue and/or contextual cues. Nicotine and heroin will be administered through an intravenous (i.v.) catheter. After training, animals will be subjected to an extinction phase, during which drugs and cues are not available. After this phase we will test the animals for cue-, context- and drug-induced relapse.

##### Outcome parameters:

1. **Self-administration:** Responses on the active lever are reinforced with nicotine or heroin infusion and associated with a 5-s cue presentation. Responses on the inactive lever are monitored but have no consequences. They serve as a discrimination index. We continue self-administration until they have adequately learned to perform the response. As response rates are typically low for drugs like nicotine and heroin on a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement (1 lever press results in 1 infusion) we increase (following stable responding on FR1) the ratio to FR2 and finally to FR3.
2. **Motivation:** here we determine the motivation to self-administer nicotine and heroin by introducing a progressive ratio schedule of reinforcement. During 4-hour sessions the number of

active responses leading to one infusion will increase along the following equation: response ratio =  $5 \times e^{(0.2 \times \text{infusion number})} - 5$ , rounded to the nearest integer.

3. Extinction phase: In this phase lever presses do not result in drug delivery.
4. Test phase: We test the ability of discrete cues, contextual cues or the previously self-administered drug to reinstate drug seeking. This is a relapse test. During the test, we record responses on the active lever, but no drug is delivered.

In all experiments the primary outcome measure is the total number of responses (i.e. lever presses) during the self-administration, extinction and relapse session on the lever that (previously) provided nicotine or heroin.

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

Each rat will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex. The rats will be given minimum 1 week to recover prior to starting the self-administration phase. During the surgery we will provide adequate anaesthesia and analgesia. After surgery we will monitor weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc., for a week.

In general, rats need approximately 10-12 daily sessions to learn the self-administration procedure on the FR1 schedule, they are then switched to an FR2 for 3-4 sessions and finally to FR3 for another 4-5 sessions.

In the **first series of experiments**, after the FR3 schedule, animals (3 groups of 14 rats for each experiment) move to the extinction phase during which responding for the drug will be extinguished. This will be done in 13-17 daily sessions. Subsequently, animals will be tested on cue- or context-induced relapse in a 60-min session. Each animal will be tested once and receives one of the three doses (0.0, 3.0 and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min-prior to the test. This time-interval is based on previous studies showing dose-dependent effects on antinociception using a similar time-interval (e.g. Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). Subsequently, responding for the cues will be extinguished in an additional series of extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced reinstatement test. In general, 10 - 12 extinction sessions are sufficient. After that animal will be tested for drug-induced relapse. To that end, animals will receive a s.c. injection of either nicotine (0.15 mg/kg) or heroin (0.25 mg/kg) and are placed in the test chamber for 60 min. In addition, each animal receives one of the three doses (0, 3-and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min prior to the test. For that, animals are randomized to new experimental groups to minimize carry-over effects of the previous test.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	extinction	cue- or context-induced relaps	Cue or context extinction	drug-induced relapse
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	13-17 daily sessions	1 session	10-12 daily sessions	1 session

Total duration is approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

In the **second series of experiments** we will test the effects of artemisinin on the reinforcing and motivational effects of heroin and nicotine. To that end, a group of 16 rats for each experiment will be used in a within-subject design. Training phase will be similar to the first series. Rats will then be tested on the FR3 and on the progressive ratio schedule of reinforcement at two i.v. doses of nicotine (40 and 10 µg/kg/inf) or heroin (100 and 25 µg/kg/inf) and at the three doses of artemisinin (0.0, 3.0 and 10.0 mg/kg i.p.). Progressive ratio sessions end after 4 h or after 1 h without earning a reward, whatever comes first. The Test (artemisinin) sessions (12) will be performed two times a week on Tuesday and Friday. Regular self-administration sessions will be performed on the days between.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	testing phase FR3	testing phase progressive ratio
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	15 daily sessions	15 daily sessions

Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **third series of experiments** study the effects of chronic treatment of artemisinin on relapse to heroin or nicotine seeking. Here we will test a more clinically relevant treatment protocol, in which artemisinin is given daily during the abstinence phase. To that end, animals (2 groups of 14 rats for each experiment) will be trained for nicotine or heroin self-administration up to an FR3 schedule of reinforcement. Subsequently, animals will be treated daily with artemisinin (at a dose that was found to be effective in the first series of experiment) or vehicle. In a previous study by others a dose regimen of 5 mg/kg i.p. once daily was found to be effective in reducing neuropathic pain over a period of 13 days (Ying et al, 2017, Neurochemistry International. In this particular experiment, rats will not be subjected to an extinction phase, to avoid a possible interference of artemisinin with the extinction learning process. Instead, after 20 days of artemisinin treatment in the home cage animals are placed in the training boxes for a more general relapse test of 60 min. During the test, there is no drug delivery, but all drug cues will be present. Animals will be tested again after 10 days to determine whether the treatment has long-lasting effects on relapse vulnerability. During these 10 days artemisinin treatment will be discontinued.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	treatment in homecage	Relaps test 1	Homecage no treatment	Relapse test 2
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	20 days	1 session	10 days	1 session

Total duration: approx. 12 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **fourth set of experiments** test the effects of intra-dmPFC infusion on cue-, context- and drug-induced relapse to nicotine and heroin seeking. The procedure will be identical to the first series of experiment. The only difference will be that now artemisinin (0, 3 and 10 µg/site) will be bilaterally infused directly into the dmPFC 10 min-prior to the relapse test. We found no previous studies on intracerebral administration of artemisinin. We base these doses on previous experience from our lab and others that in general conversion from mg/kg to µg/site gives a good estimate of pharmacologically effective doses.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	extinction	cue- or context-induced relaps	Cue or context extinction	drug-induced relapse
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	13-17 daily sessions	1 session	10-12 daily sessions	1 session

Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Intravenous nicotine and heroin self-administration has been used in this lab for many years, and is considered the most reliable model of drug self-administration in animal models around the world. We have ample experience with the above described procedures.

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

For statistical analysis of the primary outcome measure (lever pressing), we will use ANOVA to determine significant effect between groups and within the animal (post-hoc Student-Newmann-Keuls test) for all behavioural outcomes.

In all experiments, the number of rats we have proposed includes the expected number of rats that will be excluded because of experimental factors. Such as: anatomically misplaced cannula, rats that do not

acquire drug self-administration, blockade of i.v. catheter, poor health after surgery, etc. In our extensive experience the maximum exclusion rate is 25%. We need a minimum of 12 rats to be included for statistical analysis as an appropriate number to detect statistically significant effects based on the variability of animal behaviour work.

The first and third series of experiments do not include intracranial guide cannula. Therefore, we expect the exclusion rate to be less than 15%. We will therefore allocate 14 rats per group.

In the second series of experiments, catheter patency is needed for at least 9 weeks. Therefore, we expect the exclusion rate to be about 25%. For these experiments we allocate 16 rats per group.

The fourth series of experiments includes guide cannula implantation. Exclusion rate is estimated at 25%. Therefore, we will allocate 16 rats per group.

---

## **B. The animals**

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

We will use equal numbers of male and female rats because we do not expect sex to be a critical variable in our studies. Furthermore, the National Institutes of Health (USA) recently mandated equal numbers of male and female subjects in experimental research (because there was a history of bias towards male subjects), therefore we need to use equal numbers to remain consistent with worldwide animal research trends.

We are using rats because they have the cognitive capabilities required to understand the task. Indeed, the rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and heroin addiction. Nicotine and opioid use disorders are complex disorders caused by interactions between the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this it is not possible to study these questions in less complex animals.

The rats will be approximately 12 weeks old when we receive them from the supplier. The experiments will typically take around 3 months to complete from arrival in the animal facility to end of experiment.

The estimated numbers are as follows:

### First series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:

1. Cue-induced nicotine relapse
2. Cue-induced heroin relapse
3. Context-induced nicotine relapse
4. Context-induced heroin relapse

Each experiment includes 3 experimental groups of 14 rats

Total number of rats: **168**

### Second series of experiments

We will conduct 2 separate experiments:

1. i.v. nicotine self-administration
2. i.v. heroin self-administration

Each experiment includes 1 group of 16 rats

Total number of rats: **32**

### Third series of experiments

We will conduct 2 separate experiments:

1. Heroin relapse
2. Nicotine relapse

Each experiment includes 2 group of 14 rats

Total number of rats: **56**

### Fourth series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:

---



1. Cue-induced nicotine relapse
2. Cue-induced heroin relapse
3. Context-induced nicotine relapse
4. Context-induced heroin relapse

Each experiment includes 3 experimental groups of 16 rats

Total number of rats: **192**

The different decision steps in our study design will lead to the following number of rats used:

Nicotine experiments:

First series: **84** rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, no further experiments (No-Go decision)

Heroin experiments:

First series: 84 rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, second series of experiments: **16** rats (No-Go decision)

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**REPLACEMENT:** The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.

**REDUCTION:** Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.

**REFINEMENT:** We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures, and antibiotics will be administered to animals that receive an intravenous catheter.

The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.

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

The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

n.a.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

### 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 the surgeries, we will use standard surgical procedure to reduce pain and suffering. Before the start of the surgery we will provide adequate pain relief. After this, we will induce anaesthesia and maintain the anaesthetised state throughout the surgery. Prior to the skin incision, we will inject (subcutaneous) a local anaesthetic into the incision site. After surgery the animal will be monitored for a week (recording weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc.), and analgesia will be administered if necessary.

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

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

1. Animals self-administering drugs through i.v. cannula have a higher risk of infection.
2. Surgeries for the jugular catheter and implantation of intracranial guide cannula will have an impact on the animal's welfare.
3. After the surgical procedures, we will provide single-housing for the rats.
4. The training procedure itself will have an effect.

Explain why these effects may emerge.

1. Animals in the nicotine and heroin self-administration experiments have a higher risk of infection because we have implanted a jugular vein catheter which raises the risk of exposing the venous system to bacterial infections.
2. Because the surgeries involve skin incision and exposing the brain (cannula implantation) there is a risk of infection.
3. We will single-house the rats because there is a risk that shared housing results in opening wounds or destroying catheters/cannula making the animal no longer usable for the experiments.
4. The training procedure itself can impact on the animal because we will be almost daily handling them and placing them in the operant chamber.
5. Tethering the animal to the liquid swivel will cause mild discomfort initially that will reduce as the rat habituates to this experience.

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

1. We will prevent infection by using antibiotics, which are administered on a regular basis.
2. Before and after surgery we will administer antibiotics to reduce the risk of infection.
3. Unfortunately, single-housing is necessary to ensure that i.v. catheters and intracranial cannula stay intact throughout the entire experiment. To minimise the impact of single-housing we will provide adequate environmental enrichment.
4. To reduce the impact of the daily running of the experiments, the rats will only be handled by appropriately trained researchers. Proper handling of the rats significantly reduces the negative impact of handling. We expect the negative effect to reduce as rats habituate to the experimental conditions.
5. Tethering the animal to the liquid swivel will also habituate relatively quickly.

## **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.

We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:

- Loss of body weight:  $\geq 15\%$  in 24 hour period.
- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage
- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days
- Tremors/convulsions from damaged intracranial canula
- Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin
- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time

Indicate the likely incidence.

< 2%

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

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

Rats in all of the proposed experiments will experience the level of discomfort categorised as 'moderate'. Specifically this will occur at the beginning of the experiments where the surgical procedure will produce moderate discomfort. Following this all animals will undergo the behavioural training which will cause only mild discomfort.

I.P. and intracranial administration of artemisinin prior to testing and s.c. administration of nicotine and heroin to induce relapse is associated with mild discomfort. However, this discomfort will be alleviated by prior handling of the animal and the injections will only be performed by a trained researcher/technician.

Procedures	Categorie mate van ongerief*	Frequentie (interval) en duur van de handelingen	Percentage van dieren
1. Surgeries - i.v. catheter - intracranial guide cannula	Moderate Moderate	1x, max. 30 min 1x, max. 40 min	100% Max 43%
2. Behavioural procedures - i.v. self-administration  - single housing	Mild  Moderate	Range: 34-44 sessions, 5 days a week, 1-4 h Continuous for approx. 10 weeks	100%  100%
3. Injection/infusions a. Injections (i.p., s.c)  b. Intracranial infusions	Mild  Mild	Range: 3-20x, 1x every 10 days, 1x every 3 days, or daily, max. <1 min 2x, max. <3 min	100%  Max 43%
4. Termination under general anesthesia	Non-recovery		100%

The cumulative discomfort for all rats (100%) is 'moderate'

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals that had intracranial surgery will be killed to verify the correct injection site. Other animals will be killed because they will not be used for other experiments.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?
1.2 Looptijd van het project	2 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Verslaving, roken, opiaten, hersenen, terugval

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> 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)	Verslaving aan tabak en aan opiaten is een groot probleem in onze maatschappij; jaarlijks sterven er in Nederland 20.000 mensen aan de gevolgen van roken. Heroïnegebruik komt gelukkig nog maar weinig voor in de algemene bevolking. Het aantal gebruikers van de medische opioïde oxycodon laat echter bijna een verdubbeling zien tussen 2014 en 2018. Dit is een zorgelijk ontwikkeling. Zo kostte opiaatgebruik in de Verenigde Staten in 2017 aan 70.000 mensen het leven. Verslaving wordt gezien als een hersenaandoening. Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende drang om het middel te gebruiken ondanks de enorme schade die het berokkent aan het individu (compulsief gebruik). Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkels. De huidige behandelingen tegen verslaving zijn weinig effectief. In dit onderzoek testen
---	---



we de effecten van een middel dat al geregistreerd is voor andere medische toepassingen op deze twee belangrijke belemmeringen voor succesvolle behandeling: terugval en gebruik.

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Op basis van eerder onderzoek verwachten we dat dit middel de kans op terugval in nicotineverslaving en de verslavende werking van opiaten zal doen verminderen. Ook onderzoeken we welk hersencircuit betrokken is bij deze effecten. Op deze manier proberen we voldoende bewijs te verzamelen voor een eerste studie van dit middel bij mensen. Dit zou een belangrijke stap zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie tegen verslaving en het verlichten van de enorme last die verslaving legt op onze volksgezondheid en maatschappij.            |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | In totaal zijn maximaal 448 ratten nodig.   |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?                                     | Tijdens een operatie onder adequate anesthesie wordt bij de dieren een intraveneuze katheter aangelegd die nodig is om zichzelf de verslavende stoffen toe te dienen in een gedragsopstelling. Bij een deel van de dieren zal ook een canule geplaatst worden op de schedel die gebruikt wordt om het middel artemisinin direct in de hersenen toe te dienen. De operaties en het bijkomen uit de narcose kunnen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en aseptische operatietechnieken worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | Het ongerief van de dieren wordt ingeschat op maximaal matig. Het matige ongerief komt voort uit de operatie, alle andere handelingen zoals de dagelijkse trainingen en de injectieprocedures gaan gepaard met licht ongerief.  |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | Aan het einde van de proef worden de dieren gedood om de juiste injectieplaats te controleren en weefsel voor onderzoek te verzamelen.  |

## 4 Drie V's

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 4.1 | <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt. |
| 4.2 | <b>Vermindering</b><br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo   | Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats (op basis van de verkregen resultaten) over het wel of  |

gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

niet uitvoeren van vervolgexperimenten. Zo zullen vervolgexperimenten alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. Daarnaast kunnen we in één experiment meerdere parameters meten, zoals gebruik, motivatie en terugval.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De rat is het meest gebruikte diersoort in verslavingsmodellen en laat ook duidelijk verslavingsgedrag zien. Het gebruikte diersoort beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. Een positief resultaat in dit model wordt dan ook gezien als een belangrijke voorwaarde en aanleiding om verder onderzoek te doen bij mensen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Er vinden dagelijkse welzijnsrapportages plaats waarbij het dier op uiterlijke gezondheidskenmerken en welzijn wordt gescoord. Daarnaast worden adequate anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken en worden duidelijk omschreven humane eindpunten toegepast. Operaties en biotechnische handelingen worden uitgevoerd onder algehele narcose en met adequate pijnstilling door ervaren personeel aan de hand van gevalideerde protocollen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 14 april 2020 13:07  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** FW: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209667  
**Bijlagen:** NTS\_verslaving\_DEC\_14\_april.pdf.html; Project\_proposal\_verslaving\_DEC\_14\_april.pdf.html; aanvraag\_projectvergunning\_Verslaving.pdf.html; Appendix\_1\_verslaving\_DEC\_14\_april.pdf.html

Nu inclusief de bijlagen!

Excuses voor het ongemak.

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 14 april 2020 13:06  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209667

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 20209667.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 14-04-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 14-04-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

## Reactie DEC bij projectaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209667

Geachte CCD,

De 5.1 lid2h heeft het project met als titel: "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" en aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209667, besproken tijdens de DEC vergadering op 14 april en 12 mei 2020.

Tijdens de vergaderingen is naar voren gekomen dat de noodzaak van de voorgestelde dierproeven niet voldoende onderbouwd is. De DEC komt tot de conclusie dat de aanvraag en de beantwoording van vragen vanuit de DEC tot dusver onvoldoende handvatten biedt om van de urgentie van het proefdieronderzoek te overtuigen en een afweging te kunnen maken. Onduidelijk hierbij is te eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij dit reeds geregistreerde geneesmiddel tegen malaria en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapoleerbaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur, 5.1 lid2h METC, maar kan op basis van deze eerste feedback nog niet tot een oordeel komen.

De vraag van de DEC luidde: "Momenteel ligt er bij ons een project waarin wordt voorgesteld een geregistreerd geneesmiddel te testen in een diermodel bij wijze van proof-of-concept. In dit diermodel zal een (origineel anti-malaria middel) voor een nieuwe doelstelling (verslaving) worden getest, om dit later te kunnen testen in een klinische trial bij de mens. De vraag van de DEC aan de METC is of deze dierproeven noodzakelijk zijn voor de goedkeuring door een METC of dat een geregistreerd geneesmiddel voor andere doeleinden in beginsel al direct in een klinische trial in mensen kan worden getest?"

Het antwoord van de 5.1 lid2h METC luidde: "In antwoord op uw vraag: Bij een first-in-human clinical trial van een nieuw geneesmiddel moeten resultaten van dierproeven inzicht geven in de veiligheid en de werking/effectiviteit van het middel. Als een geneesmiddel al geregistreerd is, zijn gegevens omtrent veiligheid (zowel pre-klinisch als klinisch) bekend. Als het middel vervolgens voor een andere toepassing wordt getest dan waarvoor het geregistreerd is dient naar mijn mening een afweging gemaakt te worden. Op de eerste plaats dient een onderbouwing gegeven te worden waarom men verwacht dat het (geregistreerde) middel effectief is bij de nieuwe indicatie. Dit kan zijn op basis van het werkingsmechanisme van het middel (theorie), toevallige waarnemingen gedaan bij klinische toepassing van het middel (empirisch), maar ook uit resultaten van proefdieronderzoek. Daarnaast dient men rekening te houden met de belasting/eventuele risico's van de uit te voeren klinische trial. Gaat het om een eenmalig toediening van een middel of moet dit gedurende langere tijd gebruikt worden. Daarbij dient men een inschatting te maken hoe groot de kans is dat bijwerkingen optreden. Ik stel me voor dat voor een eenmalige toediening van een middel (in een gebruikelijke dosering) geen extra informatie uit proefdieronderzoek nodig is. Bij een middel met grote kans op bijwerkingen of dat langdurig gebruikt gaat worden geeft proefdieronderzoek meer onderbouwing voor een afweging van de benefit/risico verhouding van de trial. Samengevat: medisch-ethisch gezien zijn dierproeven niet strikt noodzakelijk, maar voor goedkeuring door de METC dient wel een goede onderbouwing voor de veiligheid en effectiviteit gegeven te worden".



De specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft zijn hieronder weergegeven:

1. In de antwoorden op de vragen van april geeft men aan dat het gaat om “een geregistreerd middel” (Artemisinin). Men vermeldt verder dat “een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang is om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden.” Voor de DEC blijft de vraag staan: Waarom is het noodzakelijk deze dierproeven uit te voeren? De DEC ziet graag dat dit verder onderbouwd wordt, geef informatie over waarom dit niet in mensen kan worden gedaan. De bijwerkingen en dosis zijn immers al bekend. Graag ziet de DEC dat men hierbij verwijst naar een formele opvatting van een METC, die zegt dat dierproeven noodzakelijk zijn om een onderzoek met artesimine op mensen te kunnen starten.
2. Men geef aan “onthoudingsverschijnselen treden in deze dierproef niet op”. Als de dieren niet echt verslaafd zijn, hoe is dit dan translationeel naar de patiëntenpopulatie?
3. Men geeft aan dat er al middelen zijn voor nicotineverslaving. Als er al een middel is voor nicotine, Waarom is er dan nog een ander middel nodig? Welke andere aspecten bevat dit nieuwe middel?

De bovenstaande vragen zijn inmiddels verstuurd naar de aanvrager. Het advies van de DEC is om het project voor nu aan te houden, zodat de aanvragers de kans hebben de nog ontbrekende informatie hierover aan te leveren. Daarna kunnen de DEC, en CCD, op basis hiervan mogelijk wel een afweging maken. We hopen dat dit op deze manier kan worden opgevolgd.

Vriendelijke groet,

Namens de 5.1 lid2h

**Van:** Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>  
**Verzonden:** dinsdag 26 mei 2020 09:29  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 20209667 -Niet toetsbaar-

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 09-04-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209667. Op 14-04-2020 is uw aanvraag aangeboden aan 5.1 lid2h

De DEC heeft ons laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbreekt waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kan komen, en de CCD niet kan komen tot de volledige beoordeling van uw aanvraag.

De DEC is van oordeel dat de volgende punten in de aanvraag onbreken:

Tijdens de vergaderingen is naar voren gekomen dat de noodzaak van de voorgestelde dierproeven niet voldoende onderbouwd is. De DEC komt tot de conclusie dat de aanvraag en de beantwoording van vragen vanuit de DEC tot dusver onvoldoende handvatten biedt om van de urgentie van het proefdieronderzoek te overtuigen en een afweging te kunnen maken. Onduidelijk hierbij is te eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij dit reeds geregistreerde geneesmiddel tegen malaria en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapolatiebaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur, 5.1 lid2h METC, maar kan op basis van deze eerste feedback nog niet tot een oordeel komen.

De specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft zijn hieronder weergegeven:

1. In de antwoorden op de vragen van april geeft men aan dat het gaat om "een geregistreerd middel" (Artemisinin). Men vermeldt verder dat "een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang is om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden." Voor de DEC blijft de vraag staan: Waarom is het noodzakelijk deze dierproeven uit te voeren? De DEC ziet graag dat dit verder onderbouwd wordt, geef informatie over waarom dit niet in mensen kan worden gedaan. De bijwerkingen en dosis zijn immers al bekend. Graag ziet de DEC dat men hierbij verwijst naar een formele opvatting van een METC, die zegt dat dierproeven noodzakelijk zijn om een onderzoek met artesimine op mensen te kunnen starten.
2. Men geef aan "onthoudingsverschijnselen treden in deze dierproef niet op". Als de dieren niet echt verslaafd zijn, hoe is dit dan translationeel naar de patiëntenpopulatie?
3. Men geeft aan dat er al middelen zijn voor nicotineverslaving. Als er al een middel is voor nicotine, Waarom is er dan nog een ander middel nodig? Welke andere aspecten bevat dit nieuwe middel?

Bij de besluitvorming van de CCD is het advies van de DEC zwaarwegend. Wij stellen u daarom in de gelegenheid om binnen 6 weken uw aanvraag op de door de DEC beschreven punten aan te passen. De beslistermijn wordt opgeschort

tot de dag waarop wij van u de aanvulling hebben ontvangen. Uw aanvraag zal na aanvulling via de CCD opnieuw aan de DEC worden aangeboden.

Wanneer u van mening bent dat de behandeling van uw aanvraag in zijn huidige vorm doorgang moet vinden, zal deze met het oordeel van de DEC, op basis van de ingediende documenten aan de CCD ter besluitvorming worden voorgelegd.

### **Complexe aanvraag**

Op grond van artikel 10a, achtste lid van de Wod, kan de CCD de beslistermijn met 15 werkdagen verlengen indien dat wordt gerechtvaardigd door de complexiteit of de multidisciplinaire aard van het project. Tijdens de beoordeling van uw aanvraag blijkt dit project dermate complex te zijn dat meer tijd nodig is om de aanvraag volledig te beoordelen. Er worden daarom 15 extra werkdagen toegevoegd aan de beslistermijn.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

### **5.1 lid2e**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

### DEC vragen bij aanvraag Verslaving (9667) n.a.v. vergadering op 12 mei '20

Dit is de tweede keer dat de aanvraag wordt besproken tijdens een DEC vergadering. Net als vorige keer heeft de DEC nog een aantal essentiële vragen die beantwoordt moeten worden voordat de DEC commissie een ethische afweging kan maken, het gaat daarbij vooral om mogelijk vervanging van het onderzoek in de mens.

- In de antwoorden op de vragen van april geeft men aan dat het gaat om "een geregistreerd middel" (Artemisinin). Men vermeldt verder dat "een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang is om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden." Voor de DEC blijft de vraag staan: Waarom is het noodzakelijk deze dierproeven uit te voeren? De DEC ziet graag dat dit verder onderbouwd wordt, geef informatie over waarom dit niet in mensen kan worden gedaan. De bijwerkingen en dosis zijn immers al bekend. Graag ziet de DEC dat men hierbij verwijst naar een formele opvatting van een METC, die zegt dat dierproeven noodzakelijk zijn om een onderzoek met artesimine op mensen te kunnen starten.

Ik heb begrepen dat de DEC de METC <sup>5.1 lid 2h</sup> inmiddels al heeft geraadpleegd, maar dat daar geen eensluitend oordeel op is gekomen. Ik heb naar aanleiding hiervan contact gezocht met Dr. Thomas Dorlo (NKI), een klinisch farmacoloog die gespecialiseerd is in tropische ziektes. Hij vertelde me dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU. Er zijn alleen combinaties beschikbaar met andere malariamiddelen zoals artemether+lumefantrine en dihydroartemisinine+piperquine in fixed-dose combinaties. Alleen de artemisinin derivaat artesunate kan op artsenverklaring/ compassionate use in de EU gebruikt worden voor acute malaria. Dit is echter alleen beschikbaar in een IV-formulering:

<https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/a/artesunaat>

M.a.w. artemisinin is als enkelvoudig preparaat niet geregistreerd en niet beschikbaar in de EU. Daarnaast, zoals ik eerder heb aangegeven, is er nog geen enkele evidentie dat artemisinin een therapeutisch effect heeft op verslavingsgedrag. Er zijn geen dierexperimentele en geen humane data. Op basis van positieve dierexperimentele data zou een inschatting kunnen worden gemaakt over de dosering en de behandelduur die geschikt zou zijn voor humane toepassing. En dan zal er nog een PO formulering moeten worden gemaakt. Dit zal moeten gebeuren in samenwerking met een farmaceut en brengt zeer hoge kosten met zich mee. Dr Dorlo geeft dan ook aan dat een humane trial met artemisinin (PO) voor de indicatie verslaving bij de huidige stand van zaken nog een brug te ver is. Proof-of-concept in een dierstudie is een belangrijke eerste stap om dit proces in te kunnen gaan.

In paragraaf 3.3. van het projectvoorstel is deze informatie in verkorte vorm toegevoegd:

An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols.

- Men geef aan "onthoudingsverschijnselen treden in deze dierproef niet op". Als de dieren niet echt verslaafd zijn, hoe is dit dan translationeel naar de patiëntenpopulatie?

Het optreden van onthoudingsverschijnselen wordt niet langer beschouwd als een voorwaarde voor substance use disorder/verslaving zoals geformuleerd in de DSM-5. Er lijkt ook geen relatie te bestaan tussen de ernst van de onthoudingsverschijnselen en het verslavende effect van een middel. Zo zijn de onthoudingsverschijnselen van nicotine relatief mild en die van opiaten behoorlijk sterk. Toch blijkt

uit veel studies dat nicotine minstens zo verslavend is als heroïne. In onze studies richten we ons dan ook op de motivationele component en op cue-reactiviteit (craving), omdat deze parameters een grotere voorspellende waarde hebben voor terugval in verslavingsgedrag dan onthouding.

- Men geeft aan dat er al middelen zijn voor nicotineverslaving. Als er al een middel is voor nicotine, Waarom is er dan nog een ander middel nodig? Welke andere aspecten bevat dit nieuwe middel?

Het meest effectieve middel tegen rookverslaving momenteel is varenicline (Champix). Dit middel is bij ongeveer 30% van de gebruikers effectief bij het stoppen met roken. Alle andere middelen (e.g. bupropion, nicotine replacement) zijn dus nog minder effectief. Varenicline is een partiële nicotine agonist. Het vermoedelijke werkingsmechanisme van artemisinin is de activatie van GABA-A receptoren, hetgeen dus een heel ander werkingsmechanisme is. Er zijn momenteel geen andere middelen beschikbaar voor rookverslaving die gebaseerd zijn op dit mechanisme. Gezien de enorme effecten van roken op de volksgezondheid zijn betere en effectievere middelen van groot belang.

In paragraaf 3.2. van het projectvoorstel is hierover het volgende opgenomen:

There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.



## Form

### Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Evaluation of artemisinin on the addictive properties of addiction nicotine and opioids

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Addiction is a chronically relapsing condition that exerts a significant personal and financial cost to society. One of the most commonly abused *legal* drugs, nicotine, is responsible for a significant



proportion of this cost to society with yearly 20.000 deaths in the Netherlands with more than 2 million daily smokers. Another major concern in addiction care is the recent opioid crisis in the United States (US). Although non-medical opioid use has been declining in the Netherlands, medical prescription of opioid-painkillers (over 1 million in the Netherlands) poses a major threat to health. In 2017, more than 70,000 people died from drug overdoses in the United States, making it a leading cause of injury-related death. Of those deaths, almost 68% involved a prescription or illicit opioid. Therefore, opioid and tobacco use disorder are significant risk factor for premature death and disabilities.

Although the choice to try a drug for the first time is voluntary, it can be influenced by external factors such as peer pressure, price, and, in particular, availability. Nonetheless, most people exposed to drugs do not develop addiction. At some point after continued repetition of voluntary use, the ability to control its use is lost in a subset of people. At that point, there is a compulsive, often overwhelming involuntary aspect to continue nicotine and opioid use. Most importantly, short term (weeks to months) control over nicotine and opioids appears to be possible, but given enough time relapse invariably occurs after a period of abstinence.

Recent advances in our understanding of brain function have led to the conclusion that addiction is a biological disorder, in the same manner as other psychopathologies (Dackis & O'Brien, 2005, *Nat Neurosci.*). Just as a patient suffering from depression should not be told "snap out of it, just be happy", a patient suffering from substance use disorders cannot just "choose to stop taking drugs". Instead, the patient is in need of help and proper treatment to remain abstinent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5) lists several criteria for a diagnosis of 'substance use disorder'. Whilst there are various factors which can lead to presentation with these symptoms, the key impediment to treatment is relapse. Relapse is a seemingly inevitable outcome, despite stated intentions to remain abstinent. What then, are the causes of relapse? Learned associations play an important role in nicotine and opioid addiction. With repeated drug use, the effects become associated with stimuli or cues in the environment, such as packaging, contexts, and people (Wikler, 1973, *Arch. Gen. Psychiatry*). These memories are notoriously difficult to remove, and they persist during abstinence long after cessation of opioid or nicotine use. Cues that are associated with opioids and nicotine are a key trigger for relapse, and thus critical for maintaining the cycle of opioid and nicotine addiction (Siegel, 1999, *Addiction*). Drug cues can be classified as discrete or contextual. Discrete cues are objects or sensory stimuli that are directly paired with the consumption of the drug, also referred to as drug paraphernalia. Contextual cues refer to the environment/context in which drug consumption takes place. Another factor that can trigger a relapse in abstinent drug users is re-exposure to the drug itself. A small amount of the drug taken after prolonged abstinence often causes strong craving and a so-called drug-induced relapse. There is considerable evidence that the effects of drug priming, discrete and contextual cues on drug seeking are mediated by partly distinct neural substrates (Bossert et al, 2013, *Psychopharmacology*). Treatment strategies for addiction focus on prevention of relapse, but to date these medications have limited efficacy. In this project we propose to evaluate the effects of a medication (that is used worldwide as a treatment for malaria and also as an anti-cancer drug) on the addictive properties of nicotine and opioids. We believe this drug has potential anti-addiction properties based on its actions on GABA receptors. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the CNS and exerts its effects through activation of GABA-A and GABA-B receptors. There are several lines of evidence showing that GABA signalling and in particular through the GABA-A receptor (GABAAR) is disturbed in addiction. Our own research has shown, using a rat model of nicotine addiction, that exposure to nicotine-associated cues (evoking relapse behaviour) resulted in a rapid increase in the availability of GABA-A receptors in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). Manipulation of the trafficking of these GABA-A receptors revealed that GABA-A receptors mediate an inhibitory effect on nicotine relapse and that further activation of GABA-A receptors in the dmPFC with the GABA-A receptor agonist muscimol strongly reduced the propensity to relapse upon exposure to nicotine cues. These results are in line with observations from human imaging studies that metabolic activity in the anterior cingulate cortex (ACC, the human equivalent of the dmPFC in rats) is strongly correlated with craving in human addicts (Volkow and Baler, 2014, *Neuropharmacology*) and studies showing reduced levels of GABA in the ACC of addicted subjects (Prescot et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*; Abé et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*) Variations in GABAAR also play a significant role in impulsivity traits that are related to drug abuse

(Stephens et al, 2017, Genes, Brain Behav.). In humans the GABAAR gene subtype has been linked to a variety of clinical disorders characterized by a lack of impulse control and pharmacological activation of GABAAR reverses increased impulsivity and high alcohol consumption in rats (Gondré-Lewis et al, 2016, Stress). Finally, the neurotransmitter dopamine (DA), a critical moderator of addiction behaviour has recently been shown to act as a direct modulator of GABAAR, in particular of GABAA receptors carrying the  $\beta 3$  subunit (Hoerbelt et al, 2015, J Neurosci.). It has been postulated that high concentrations of DA (resulting from drug exposure) may result in a disrupted DA-GABA relationship in the brain. All these lines of evidence lead to the hypothesis that enhancing GABA-A transmission may have therapeutic value in the treatment of drug addiction.

There are several registered medications that enhance GABAAR-signalling, such as very recently shown for the natural occurring anti-malarial drug artemisinin (Klayman, 1985, Science). Artemisinin not only (a) enhances GABAAR signalling (Berishvili, 2017, Cell); (b) but also affects the GABAAR $\beta 3$ -subunit (its effects on GABAAR signalling are counteracted by the  $\beta 3$ -GABAAR antagonist picrotoxin (Berishvili, 2017, Cell); (c) and has antinociceptive effects. The antinociceptive (pain-killing) effects of artemisinin are also mediated by activation of GABAAR (Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). This is of particular interest as the antinociceptive and reinforcing effects of opioids are also mediated through GABA neurotransmission. As such, artemisinin may directly interfere with the effects of opioids.

Importantly, artemisinin at clinically relevant doses is in general well tolerated with mild adverse reactions such as nausea, reduced appetite, vomiting in >10% of humans (Klayman, 1985, Science), also within its application in oncology (Slezakova and Ruda-Kucerova, 2017, Anticancer Res.). This is in contrast to most GABAAR agonists, including benzodiazepines, which have limited clinical utility because of sedative side-effects, dependence, tolerance and withdrawal (Fischer, 2017, CNS & Neurological Disorders).

Therefore, we postulate that artemisinin is a relatively safe and promising candidate for the treatment of opioid and nicotine addiction. Our studies will be a first step towards clinical evaluation of artemisinin in addiction treatment. Positive results will be used to design a first clinical trial in collaboration with addiction psychiatrists and treatment centers in the Netherlands. It is important to note that this is the first attempt to evaluate the potential anti-addiction properties of artemisinin. If a positive Proof-of-Concept outcome will be obtained in animals, we hope to get approval for testing in humans.

We have chosen to focus on both nicotine and opioids use in the same project. There is increasing evidence in the literature that different drugs of abuse act on different neurobiological mechanisms. Therefore, in this project we will use the same pharmacological approaches to study addiction to two different drugs of abuse. This will allow us to identify similarities and differences in the neurobiological substrates of addiction to these two drugs. Based on the literature and our own studies we speculate that artemisinin will reduce the reinforcing value of opioids and reduce cue-induced relapse to these drugs. We will use heroin as the opioid of choice in our experiments as we have ample experience with this drug in our animal models. It is important to note that opioids like heroin and the medically approved morphine, fentanyl and oxycodone, all exert their primary action through activation of the same mu-opioid receptor.

### 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 **main objective** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin-self-administration and relapse.

Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. **For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This**



drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.
2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?
3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?

This would be the first study to evaluate artemisinin as a potential anti-addiction treatment. Given the strong predictive value of our models, positive results would be a major first step in the development of novel pharmacotherapies to treat tobacco and (prescription) opioid addiction and potentially other addictions.

We have budgeted 5 years for this project because each of the behavioral experiments takes approx. 3 months to complete. We have strong experience in the operation of behavioral experiments looking at self-administration and relapse. Furthermore, we have experience using the proposed methodology for intracranial infusions of drugs that are crucial to increase our understanding of the neural mechanisms and substrates of relapse.

Our facility has an adequate number of operant chambers, housing facilities, and full-time staff to complete all of these experiments within the 5-year time-frame of the protocol. Furthermore, all of the equipment is already present.

---

### 3.3 Relevance

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

In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.

In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world ([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf)). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017.

Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. **An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols.** Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.

### 3.4 Research strategy

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

The **overarching aim** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.

We are using well validated animal models of i.v. self-administration and relapse. These models allow us to evaluate effects of artemisinin on (a) the reinforcing properties of heroin and nicotine, (b) on the motivational properties of both drugs (using progressive ratio schedules of reinforcement) and (c) on cue-, context- and drug-induced relapse.

Although our main focus is on relapse prevention, it is important to also evaluate artemisinin effects on other behavioural readouts (e.g. drug consumption and the motivation to take drugs) to obtain a full picture of the potential therapeutic value of this compound and the underlying mechanisms.

##### First series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse. Doses of artemisinin will be based on recent literature showing antinociceptive effects in a dose range of 2.5 – 10 mg/kg following i.p. administration. These effects were blocked by a GABA-R antagonist, providing evidence that they were mediated through activation of GABA-A receptors. Therefore, we will use a similar dose range in our experiments. We will use a between-subject design (3 groups) to study the effects of 0, 3 and 10 mg/kg i.p. of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse to heroin and nicotine seeking in 4 separate experiments.

##### Second series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on drug consumption and on the motivation to use heroin and nicotine.

In case of nicotine; experiments will only be performed if the first series of experiments show a reduction in either cue-, context- or drug-induced relapse.

In case of heroin; given the fact that both artemisinin and opioids exert their effects directly or indirectly through GABA-A signalling, we speculate that the reinforcing effects of heroin will be affected by artemisinin. Therefore, regardless of the outcome of the relapse studies (that are performed under heroin-free conditions), we will conduct these experiments.

We will use a within-subject design to test 3 doses of artemisinin on heroin (or nicotine) self-administration under a fixed ratio schedule of reinforcement and under a progressive ratio schedule of reinforcement. The latter schedule is designed to measure the motivational properties of drugs.

##### Third series of experiments:

If positive effects on relapse are observed in our first series of experiments, we will here evaluate artemisinin in a more clinically relevant dose regimen (go/no go moment). In clinical settings medical treatment usually occurs with chronic treatment protocols where medication is taken for several weeks or months. In order to evaluate whether prolonged treatment with artemisinin will reduce the propensity to relapse, animals will receive daily injections of artemisinin during the 3 weeks abstinence phase of the self-administration – relapse protocol. We will use a between subject design with 2 groups. The dose of artemisinin will be based on the outcome of the first series of experiments.

##### Fourth series of experiments:

In a final set of experiments, we will test our hypothesis that the relapse-attenuating effects of artemisinin are mediated in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). To that end, animals will be implanted with guide cannula directed at the dmPFC, allowing intracranial infusion of artemisinin prior to the relapse test. These experiments will only be performed after a positive result on relapse in the first series of experiments (go/no go moment).

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.

**Surgeries:**

All rats will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will (in the same surgical session) also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

**Artemisinin treatment:**

In the first series of experiment we will evaluate the acute effects of artemisinin on relapse behaviour. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per relapse test and each rat will be tested twice. In second series we will evaluate the acute effects of artemisinin on the reinforcing and motivational properties of heroin and nicotine. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per test and each rat will be tested 6 times. In the third series of experiments we will evaluate the chronic effects of artemisinin on relapse. Rats will be injected daily with artemisinin or vehicle for 20 days. In the fourth series of experiments we will evaluate the acute intracranial (dmPFC) effects of artemisinin on relapse. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 µg) per relapse test and each rat will be tested twice.

**Behavioural task:**

The self-administration - relapse model consists of a **self-administration phase** during which responding on a lever results in the i.v. infusion of a drug (heroin or nicotine).

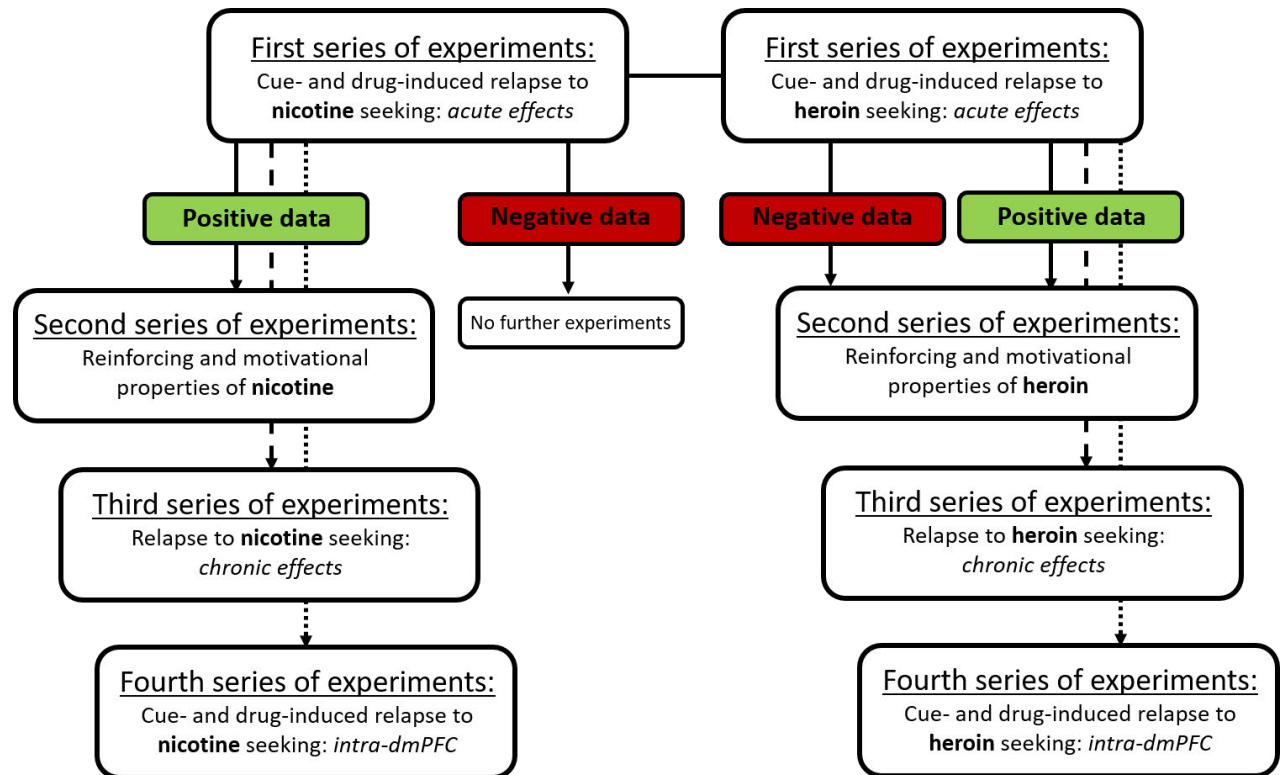
In a cue-induced relapse experiment a 5 second tone/light stimulus (discrete cue) is presented during the infusion. In some experiments, animals will be subjected to a progressive ratio schedule of reinforcement, tailored to measure the motivational properties of the drug. During a progressive ratio schedule, the number of lever presses needed to obtain an infusion of the drug will be progressively increased until a so-called breakpoint is reached. The self-administration phase is followed by an **extinction phase** during which responding for the drug will be extinguished. During this phase, lever presses do not result in drug delivery and presentation of the discrete cues. Subsequently, a relapse is provoked by re-introducing the discrete cues and the ability to respond for these cues. No drug is delivered during the relapse test. After the **cue-induced relapse test**, the discrete cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test. Previous work has indicated that drug-induced relapse is more robust in the presence of previously extinguished drug-associated cues.

In **context-induced relapse experiments**, rats will be randomly assigned to one of two different contexts. These contexts differ in **auditory** (white noise (70 dB), either continuous or interval (5 s on, 5 s off)), **olfactory** (either lemon-scented or almond-scented odour) and **tactile** cues (chamber floor: a flat PVC surface with either holes or straight grooves). The extinction phase takes place in the other context. During daily sessions in a distinct context and without drug delivery responding for the drug will be extinguished. Context-induced relapse is then tested by placing the rats again in the drug-associated (training) context with no drug delivery. After the context-induced relapse test, the drug cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test.

We will evaluate the effects of artemisinin on the different parameters of the behavioural task: on drug self-administration, progressive ratio responding and cue-, context- and drug-induced relapse.

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

The study as a whole is designed to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse. For each series of experiments, there are specific decision points that will guide future experiments.



Outline of decision points where rats will be used or not depending on the outcome of experiments.

The first series of experiments focus on the acute effects of artemisinin on cue- (discrete and context) and drug-induced relapse of nicotine and heroin seeking. Based on our previous work and that by others we hypothesize that artemisinin will be effective in reducing relapse to nicotine. If so, we will continue with the second, third and fourth series of experiments. If not, no further experiments with nicotine will be performed. In parallel, we will investigate the acute effects of artemisinin on relapse to heroin seeking. Again, positive effects will lead to the second, third and fourth series of experiments. If the first series of experiments with heroin yield negative results, we will still conduct the second series of experiments with heroin. This is because GABA-AR activation by artemisinin may directly interfere with the reinforcing effects of heroin. However, third and fourth series of experiments with heroin will not be performed in that case.

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	Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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.

**Behavioral approach:** We use a rat self-administration-relapse model to study the modulatory role of Artemisinin on heroin and nicotine self-administration, motivation, and cue-, context-, and drug-induced relapse.

##### Description of the general design for behavioural training:

Separate groups of adult male and female rats will be trained to self-administer nicotine or heroin in the presence of a discrete compound (tone + light) cue and/or contextual cues. Nicotine and heroin will be administered through an intravenous (i.v.) catheter. After training, animals will be subjected to an extinction phase, during which drugs and cues are not available. After this phase we will test the animals for cue-, context- and drug-induced relapse.

##### Outcome parameters:

1. Self-administration and dose response: Responses on the active lever are reinforced with nicotine or heroin infusion and associated with a 5-s cue presentation. Responses on the inactive lever are monitored but have no consequences. They serve as a discrimination index. We continue self-administration until animals have adequately learned to perform the response. As response rates are typically low for drugs like nicotine and heroin on a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement (1 lever press results in 1 infusion) we increase (following stable responding on FR1) the ratio to FR2 and finally to FR3. Subsequently, we will test the acute effects of artemisinin on responding for two different doses of nicotine or heroine. Read-out parameters

are: 1) the number of active levers presses and 2) the number of rewards (drug infusions) earned during the test session.

2. Motivation: here we determine the motivation to self-administer nicotine and heroin by introducing a progressive ratio schedule of reinforcement. During 4-hour sessions the number of active responses leading to one infusion will increase along the following equation: response ratio =  $5 \times e^{(0.2 \times \text{infusion number})} - 5$ , rounded to the nearest integer. Subsequently, we will test the acute effects of artemisinin on the motivation to self-administer nicotine or heroin. Read-out parameters are: 1) the final completed ratio and 2) the total active lever presses during the test session.
3. Extinction phase: In this phase lever presses do not result in drug delivery. During this phase responding on the active lever will be extinguished which is necessary to prepare the animals for the relapse tests.
4. Relapse tests: We test the ability of discrete cues (5 second tone/light stimulus), contextual cues (auditory, olfactory and tactile cues) or the previously self-administered drug (nicotine or heroin) to reinstate drug seeking. This is a relapse test. During the test, we record responses on the active lever, but no drug is delivered. The total active lever presses will be taken as readout for relapse vulnerability. We will test the acute and subchronic effects of artemisinin on relapse vulnerability.

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

Each rat will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will (during the same surgical session) also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

The rats will be given minimum 1 week to recover prior to starting the self-administration phase. During the surgery we will provide adequate anaesthesia and analgesia. After surgery we will monitor weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc., for a week.

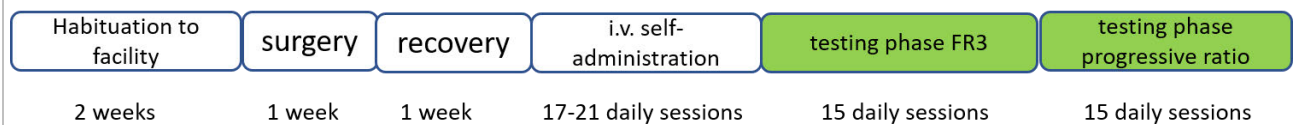
In general, rats need approximately 10-12 daily sessions to learn the self-administration procedure on the FR1 schedule, they are then switched to an FR2 for 3-4 sessions and finally to FR3 for another 4-5 sessions.

In the **first series of experiments**, after the FR3 schedule, animals (3 groups of 14 rats for each experiment) move to the extinction phase during which responding for the drug will be extinguished. This will be done in 13-17 daily sessions. Subsequently, animals will be tested on cue- or context-induced relapse in a 60-min session. Each animal will be tested once and receives one of the three doses (0.0, 3.0 and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min-prior to the test. This time-interval is based on previous studies showing dose-dependent effects on antinociception using a similar time-interval (e.g. Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). Subsequently, responding for the cues will be extinguished in an additional series of extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced reinstatement test. In general, 10 - 12 extinction sessions are sufficient. After that animal will be tested for drug-induced relapse. To that end, animals will receive a s.c. injection of either nicotine (0.15 mg/kg) or heroin (0.25 mg/kg) and are placed in the test chamber for 60 min. In addition, each animal receives one of the three doses (0, 3-and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min prior to the test. For that, animals are randomized to new experimental groups to minimize carry-over effects of the previous test.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	extinction	cue- or context-induced relaps	Cue or context extinction	drug-induced relapse
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	13-17 daily sessions	1 session	10-12 daily sessions	1 session

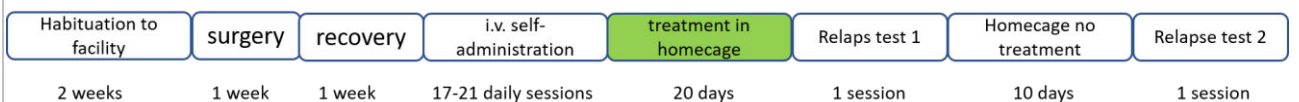
Total duration is approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

In the **second series of experiments** we will test the effects of artemisinin on the reinforcing and motivational effects of heroin and nicotine. To that end, a group of 16 rats for each experiment will be used in a within-subject design. Training phase will be similar to the first series. Rats will then be tested on the FR3 and on the progressive ratio schedule of reinforcement at two i.v. doses of nicotine (40 and 10 µg/kg/inf) or heroin (100 and 25 µg/kg/inf) and at the three doses of artemisinin (0.0, 3.0 and 10.0 mg/kg i.p.). Progressive ratio sessions end after 4 h or after 1 h without earning a reward, whatever comes first. The Test (artemisinin) sessions (12) will be performed two times a week on Tuesday and Friday. Regular self-administration sessions will be performed on the days between.



Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **third series of experiments** study the effects of chronic treatment of artemisinin on relapse to heroin or nicotine seeking. Here we will test a more clinically relevant treatment protocol, in which artemisinin is given daily during the abstinence phase. To that end, animals (2 groups of 14 rats for each experiment) will be trained for nicotine or heroin self-administration up to an FR3 schedule of reinforcement. Subsequently, animals will be treated daily with artemisinin (at a dose that was found to be effective in the first series of experiment) or vehicle. In a previous study by others a dose regimen of 5 mg/kg i.p. once daily was found to be effective in reducing neuropathic pain over a period of 13 days (Ying et al, 2017, Neurochemistry International. In this particular experiment, rats will not be subjected to an extinction phase, to avoid a possible interference of artemisinin with the extinction learning process. Instead, after 20 days of artemisinin treatment in the home cage animals are placed in the training boxes for a more general relapse test of 60 min. During the test, there is no drug delivery, but all drug cues will be present. Animals will be tested again after 10 days to determine whether the treatment has long-lasting effects on relapse vulnerability. During these 10 days artemisinin treatment will be discontinued.



Total duration: approx. 12 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **fourth set of experiments** test the effects of intra-dmPFC infusion on cue-, context- and drug-induced relapse to nicotine and heroin seeking. The procedure will be identical to the first series of experiment. The only difference will be that now artemisinin (0, 3 and 10 µg/site) will be bilaterally infused directly into the dmPFC 10 min-prior to the relapse test. We found no previous studies on intracerebral administration of artemisinin. We base these doses on previous experience from our lab and others that in general conversion from mg/kg to µg/site gives a good estimate of pharmacologically effective doses.



Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.



Intravenous nicotine and heroin self-administration has been used in this lab for many years, and is considered the most reliable model of drug self-administration in animal models around the world. We have ample experience with the above described procedures.

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

For statistical analysis of the primary outcome measure (lever pressing), we will use ANOVA to determine significant effect between groups and within the animal (post-hoc Student-Newmann-Keuls test) for all behavioural outcomes.

In all experiments, the number of rats we have proposed includes the expected number of rats that will be excluded because of experimental factors. Such as: anatomically misplaced cannula, rats that do not acquire drug self-administration, blockade of i.v. catheter, poor health after surgery, etc. In our extensive experience the maximum exclusion rate is 25%. We need a minimum of 12 rats to be included for statistical analysis as an appropriate number to detect statistically significant effects based on the variability of animal behaviour work. We are using a Wistar outbred strain and have over 25 years of experience with i.v. self-administration protocols using this strain. As such, individual variability in behavioural performance is taken into account in the group sizes.

The first and third series of experiments do not include intracranial guide cannula. Therefore, we expect the exclusion rate to be less than 15%. We will therefore allocate 14 rats per group.

In the second series of experiments, catheter patency is needed for at least 9 weeks. Therefore, we expect the exclusion rate to be about 25%. For these experiments we allocate 16 rats per group.

The fourth series of experiments includes guide cannula implantation. Exclusion rate is estimated at 25%. Therefore, we will allocate 16 rats per group.

## **B. The animals**

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

We will use equal numbers of male and female rats because we do not expect sex to be a critical variable in our studies. Furthermore, the National Institutes of Health (USA) recently mandated equal numbers of male and female subjects in experimental research (because there was a history of bias towards male subjects), therefore we need to use equal numbers to remain consistent with worldwide animal research trends.

We are using rats because they have the cognitive capabilities required to understand the task. Indeed, the rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and heroin addiction. Nicotine and opioid use disorders are complex disorders caused by interactions between the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this it is not possible to study these questions in less complex animals.

The rats will be approximately 12 weeks old when we receive them from the supplier. The experiments will typically take around 3 months to complete from arrival in the animal facility to end of experiment.

The estimated numbers are as follows:

### First series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:

1. Cue-induced nicotine relapse
2. Cue-induced heroin relapse
3. Context-induced nicotine relapse
4. Context-induced heroin relapse

Each experiment includes 3 experimental groups of 14 rats

Total number of rats: **168**

### Second series of experiments



We will conduct 2 separate experiments:  
1. i.v. nicotine self-administration  
2. i.v. heroin self-administration  
Each experiment includes 1 group of 16 rats  
Total number of rats: **32**

Third series of experiments

We will conduct 2 separate experiments:  
1. Heroin relapse  
2. Nicotine relapse  
Each experiment includes 2 group of 14 rats  
Total number of rats: **56**

Fourth series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:  
1. Cue-induced nicotine relapse  
2. Cue-induced heroin relapse  
3. Context-induced nicotine relapse  
4. Context-induced heroin relapse  
Each experiment includes 3 experimental groups of 16 rats  
Total number of rats: **192**

The different decision steps in our study design will lead to the following number of rats used:

Nicotine experiments:

First series: **84** rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, no further experiments (No-Go decision)

Heroin experiments:

First series: 84 rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, second series of experiments: **16** rats (No-Go decision)

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

REPLACEMENT: The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.

REDUCTION: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we

have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.

REFINEMENT: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures. The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.

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

The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

n.a.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

### 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 the surgeries, we will use standard surgical procedure to reduce pain and suffering. Before the start of the surgery we will provide adequate pain relief. After this, we will induce anaesthesia and maintain the anaesthetised state throughout the surgery. Prior to the skin incision, we will inject (subcutaneous) a local anaesthetic into the incision site. After surgery the animal will be monitored for a week (recording weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc.), and analgesia will be administered if necessary.

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

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

1. Animals self-administering drugs through i.v. cannula have a higher risk of infection.
2. Surgeries for the jugular catheter and implantation of intracranial guide cannula will have an impact on the animal's welfare.
3. After the surgical procedures, we will provide single-housing for the rats.
4. The training procedure itself will have an effect.
5. Possible side-effects of artemisinin: Hypoactivity in rats has been observed at doses of 50 and 100 mg/kg artemisinin (Amos et al., 2003; Brain Res. Bull.). The dose range used here is 3 – 10 mg/kg, reducing the likelihood of reduced spontaneous motor activity. Hypoactivity is not reported in humans at clinically relevant doses. More than 10% reports loss of appetite and nausea.
6. The self-administration protocols of nicotine and heroin used here will not lead to physical signs of withdrawal during abstinence.

Explain why these effects may emerge.

1. Animals in the nicotine and heroin self-administration experiments have a higher risk of infection because we have implanted a jugular vein catheter which raises the risk of exposing the venous system to bacterial infections.
2. Because the surgeries involve skin incision and exposing the brain (cannula implantation) there is a risk of infection.
3. We will single-house the rats because there is a risk that shared housing results in opening wounds or destroying catheters/cannula making the animal no longer usable for the experiments.
4. The training procedure itself can impact on the animal because we will be almost daily handling them and placing them in the operant chamber.
5. Tethering the animal to the liquid swivel will cause mild discomfort initially that will reduce as the rat habituates to this experience.

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

1. We will prevent infection by sterilizing all solutions before i.v. infusion.
2. Unfortunately, single-housing is necessary to ensure that i.v. catheters and intracranial cannula stay intact throughout the entire experiment. To minimise the impact of single-housing we will provide adequate environmental enrichment.
3. To reduce the impact of the daily running of the experiments, the rats will only be handled by appropriately trained researchers. Proper handling of the rats significantly reduces the negative impact of handling. We expect the negative effect to reduce as rats habituate to the experimental conditions.
4. Tethering the animal to the liquid swivel will also habituate relatively quickly.
5. Possible side effects artemisinin:
  - hypoactivity: We monitor the number of responses on the inactive lever (not associated with drug delivery) in each session. This gives a good indication of motor impairment induced by experimental compounds.
  - loss of appetite and nausea: animal weight and condition will be monitored throughout the experiment

## 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.

We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:

- Loss of body weight:  $\geq 15\%$  in 24 hour period.
- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage
- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days
- Tremors/convulsions from damaged intracranial canula
- Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin
- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time

Indicate the likely incidence.

< 2%

## K. Classification of severity of procedures

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

Rats in all of the proposed experiments will experience the level of discomfort categorised as 'moderate'. Specifically this will occur at the beginning of the experiments where the surgical procedure will produce moderate discomfort. Following this all animals will undergo the behavioural training which will cause only mild discomfort.

I.P. and intracranial administration of artemisinin (including possible side-effects) prior to testing and s.c. administration of nicotine and heroin to induce relapse is associated with mild discomfort. However, this discomfort will be alleviated by prior handling of the animal and the injections will only be performed by a trained researcher/technician.

Procedures	Categorie mate van ongerief*	Frequentie (interval) en duur van de handelingen	Percentage van dieren
1. Surgeries <ul style="list-style-type: none"><li>- i.v. catheter</li><li>- i.v. catheter and intracranial guide cannula</li></ul>	Moderate Moderate	1x, max. 30 min 1x, max. 40 min	100% Max 43%
2. Behavioural procedures <ul style="list-style-type: none"><li>- i.v. self-administration</li><li>- single housing</li></ul>	Mild Moderate	Range: 34-44 sessions, 5 days a week, 1-4 h Continuous for approx. 10 weeks	100% 100%
3. Injection/infusions <ul style="list-style-type: none"><li>a. Injections (i.p., s.c)</li><li>b. Intracranial infusions</li></ul>	Mild Mild	Range: 3-20x, 1x every 10 days, 1x every 3 days, or daily, max. <1 min 2x, max. <3 min	100% Max 43%
4. Termination under general anesthesia	Mild Non-recovery	Transcardial perfusion	57% 43%

The cumulative discomfort for all rats (100%) is 'moderate'

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals that had intracranial surgery will be killed to verify the correct injection site. Other animals will be killed because they will not be used for other experiments.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project    | Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving? |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Verslaving, roken, opiaten, hersenen, terugval                                 |

### 2 Categorie van het project

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> 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) | Verslaving aan tabak en aan opiaten is een groot probleem in onze maatschappij; jaarlijks sterven er in Nederland 20.000 mensen aan de gevolgen van roken. Heroïnegebruik komt gelukkig nog maar weinig voor in de algemene bevolking. Het aantal gebruikers van de medische opioïde oxycodon laat echter bijna een verdubbeling zien tussen 2014 en 2018. Dit is een zorgelijk ontwikkeling. Zo kostte opiaatgebruik in de Verenigde Staten in 2017 aan 70.000 mensen het leven. Verslaving wordt gezien als een hersenaandoening. Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende drang om het middel te gebruiken ondanks de enorme schade die het berokkent aan het individu (compulsief gebruik). Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkels. De huidige behandelingen tegen verslaving zijn weinig effectief. In dit onderzoek testen |
|---|---|

we de effecten van een middel dat (buiten de EU) al geregistreerd is voor andere medische toepassingen op deze twee belangrijke belemmeringen voor succesvolle behandeling: terugval en gebruik.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Op basis van eerder onderzoek verwachten we dat dit middel de kans op terugval in nicotineverslaving en de verslavende werking van opiaten zal doen verminderen. Ook onderzoeken we welk hersencircuit betrokken is bij deze effecten. Op deze manier proberen we voldoende bewijs te verzamelen voor een eerste studie van dit middel bij mensen. Dit zou een belangrijke stap zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie tegen verslaving en het verlichten van de enorme last die verslaving legt op onze volksgezondheid en maatschappij.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- In totaal zijn maximaal 448 ratten nodig.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Tijdens een operatie onder adequate anesthesie wordt bij de dieren een intraveneuze katheter aangelegd die nodig is om zichzelf de verslavende stoffen toe te dienen in een gedragsopstelling. Bij een deel van de dieren zal ook een canule geplaatst worden op de schedel die gebruikt wordt om het middel artemisinin direct in de hersenen toe te dienen. De operaties en het bijkomen uit de narcose kunnen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en aseptische operatietechnieken worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Het ongerief van de dieren wordt ingeschat op maximaal matig. Het matige ongerief komt voort uit de operatie, alle andere handelingen zoals de dagelijkse trainingen en de injectieprocedures gaan gepaard met licht ongerief.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Aan het einde van de proef worden de dieren gedood om de juiste injectieplaats te controleren en weefsel voor onderzoek te verzamelen.

## 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.
- Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo
- Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats (op basis van de verkregen resultaten) over het wel of

gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

niet uitvoeren van vervolgexperimenten. Zo zullen vervolgexperimenten alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. Daarnaast kunnen we in één experiment meerdere parameters meten, zoals gebruik, motivatie en terugval.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De rat is het meest gebruikte diersoort in verslavingsmodellen en laat ook duidelijk verslavingsgedrag zien. Het gebruikte diertype model beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. Een positief resultaat in dit model wordt dan ook gezien als een belangrijke voorwaarde en aanleiding om verder onderzoek te doen bij mensen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Er vinden dagelijkse welzijnsrapportages plaats waarbij het dier op uiterlijke gezondheidskenmerken en welzijn wordt gescoord. Daarnaast worden adequate anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken en worden duidelijk omschreven humane eindpunten toegepast. Operaties en biotechnische handelingen worden uitgevoerd onder algehele narcose en met adequate pijnstilling door ervaren personeel aan de hand van gevalideerde protocollen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 2 juni 2020 15:56  
**Aan:** Info-zbo; 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209667 -na niet toetsbaar-  
**Bijlagen:** Appendix 1\_Verslaving 9667\_28 mei.pdf.html; Project-proposal\_Verslaving 9667\_28 mei.pdf.html; NTS\_Verslaving 9667\_28 mei.pdf.html; DEC vragen 12 mei\_Verslaving 9667\_antwoorden 28 mei.pdf.html

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u opnieuw in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 20209667.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 02-06-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 02-06-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
 Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

## Format DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
 NVWA nummer **5.1 lid2h**, AVD **5.1 lid2h** 20209667
2. Titel van het project:  
*Evaluation of artemisinin on the addictive properties of addiction nicotine and opioids*
3. Titel van de NTS:  
*Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **5.1 lid2h**
  - telefoonnummer contactpersoon: **5.1 lid2e**
  - e-mailadres contactpersoon: **5.1 lid2h**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 09-04-2020
  - aanvraag compleet:
  - in vergadering besproken: 14-04-2020, 12-05-2020 en 09-06-2020
  - anderszins behandeld: n.v.t.
  - termijnonderbreking(en) van / tot: 16-04-2020 tot 02-05-2020 en 25-05-2020 tot 02-06-2020
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: ja op 02-06-2020
  - aanpassing aanvraag: 02-06-2020
  - advies aan CCD: 10-07-2020
7. Afstemming IvD
  - Datum advies IvD: 09-04-2020
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager

#### Vraagronde 1

- Datum: 16-04-2020
- Strekking gestelde vragen: *De DEC heeft de aanvraag bekeken en heeft een aantal essentiële vragen die beantwoordt moeten worden voordat de DEC commissie een ethische afweging kan maken. Het gaat hierbij vooral om de beschreven belangen van het onderzoek en de 3V's. 1. NTS: Hierin staat een looptijd van 2 jaar(?), terwijl in het projectvoorstel (onderdeel 3.2) 5 jaar wordt genoemd. Dit lijkt niet te kloppen, graag nakijken en consistent maken. 2. Het lijkt hier te gaan om het testen van een geregistreerd middel/medicijn, dus waarom kun je dit niet direct in mensen/patiënten testen? (zie ook vervanging). Gaat het hier*

om een plantenextract? Is dit een geregistreerd middel? 3. De belangen van het onderzoek zijn nog niet helder voor de DEC: Graag krijgt men meer uitleg over het fundamentele wetenschappelijk belang van het onderzoek. Welke specifieke wetenschappelijke kennis verkrijgt je met de resultaten van dit onderzoek? Wat is precies het maatschappelijke belang van dit specifieke onderzoek? Wat is de translationele waarde? Zit de translatie wel in dit onderzoek? Indien nee, waarom niet? Indien ja, graag meer uitleg over waarom er sprake is van translatie. Worden er na dit onderzoek ook klinische trials in mensen/patiënten gedaan? 4. Moet je artemisinin je hele leven slikken om effect te krijgen? Of is het tijdelijk (is er een acute fase)? De context gerelateerde fase kan bij mensen meerdere jaren duren. Wat is de duur van de medicatie toediening bij de dieren? Hoe is dit vergelijkbaar met de humane situatie? Kunnen deze resultaten van de dierproef worden gegeneraliseerd? 5. Bijlage onderdeel A Onderbouwing proefopzet/experimenten: Het is de DEC niet duidelijk welke experimenten en handelingen er nu precies worden uitgevoerd. Wat gaat er nu precies verzameld worden (data)? Wat doet men met de dieren aan het eind (na afloop) van de proef? Wat is de wetenschappelijke read-out naast relapse? Graag begrijpelijke termen en read-out parameters benoemen in combinatie met specifieke stimuli van een context of een veranderde context. 6. Bijlage onderdeel I onderbouwing bijwerkingen: Noem hier ook mogelijke bijwerkingen van artemisinin bij ratten (tenminste tijdelijke hypoactiviteit of andere effecten, en neem deze mee in de tabel over ongeriefinschatting onderdeel K), bij meer dan 10% van de mensen komt dit voor staat in 3.1 achtergrond. Of krijgen de dieren geen onthoudingsverschijnselen? Dit moet worden toegevoegd. 7. Bijlage onderdeel L, Wat doet men met de dieren aan het eind (na afloop) van de proef? Verzameld en onderzoekt men het weefsel van de dieren (bv. verandering van expressie van GABAAR door artemisinin in verschillende hersengebieden)? Zo ja, welke weefsels en welke data haalt men hieruit?

- Datum antwoord: 02-05-2020
- Strekking van de antwoord(en): 1. Is aangepast (looptijd nu 5 jaar). 2. Er is nog geen enkele evidentie voor de effectiviteit van artemisinin bij het onderdrukken van verslavingsgedrag (noch bij mensen, noch bij dieren). Daarom is een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden. Het werkingsmechanisme lijkt anders te zijn dan van benzodiazepines. Naar mijn weten zijn er geen anxiolytische effecten beschreven. 3. De wetenschappelijke en maatschappelijke relevantie is nog wat specifieker beschreven in 3.3: Positieve resultaten van dit onderzoek zullen dus de basis vormen voor een vervolgaanvraag met klinische partners waarbij klinische trials bij mensen zullen worden aangevraagd. 4. Deze vragen zullen uiteindelijk in klinisch vervolgonderzoek moeten worden beantwoord. Reguliere behandeling van verslaving met medicijnen varieert van weken tot maanden en past vaak in een behandeltraject met meerdere vormen van therapie (bv cognitieve gedragstherapie). Onze studie is een eerste proof-of-concept studie naar de acute en subchronische effecten van artemisinin op een aantal belangrijke verslavingsparameters zoals motivatie en terugval. 5. De 'outcome/readout parameters' zijn in meer detail beschreven onder A. 6. Hypoactiviteit bij ratten is waargenomen bij doseringen van 50 en 100 mg/kg artemisinin (Amos et al., 2003; Brain Res. Bull.). Aangezien de door ons gebruikte doseringen veel lager liggen (3 - 10 mg/kg) is de kans hierop kleiner. Hypoactiviteit is niet gerapporteerd bij mensen als bijverschijnsel onder klinische doseringen. Wel zijn verlies van eetlust en misselijkheid gerapporteerd bij meer dan 10%. In de ratten zal dit worden gemonitord aan de hand van de gewichten van de dieren in de standaard welzijnsrapportage. Onthoudingsverschijnselen treden niet op onder de experimentele condities van zelftoediening zoals hier gebruikt. 7. Bij de dieren met een hersencanule zullen de breintjes worden verzameld om de injectieplaats te controleren. Deze experimenten zijn niet ontworpen om nog nadere moleculaire bepalingen te doen op het hersenweefsel. Hiervoor zouden additionele controlegroepen nodig zijn met dieren die geen artemisinin behandeling krijgen of die niet tweemaal getest worden op terugval (relapse). In

*deze proof-of-concept studies staan de gedragseffecten centraal en daarop is het design gebaseerd.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

### Vraagronde 2

- Datum: 26-05-2020
- Strekking gestelde vragen: *De specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft zijn hieronder weergegeven: 1. In de antwoorden op de vragen van april geeft men aan dat het gaat om "een geregistreerd middel" (Artemisinin). Men vermeldt verder dat "een eerste proof-of-concept in een dierexperiment van groot belang is om medisch-ethische toestemming te krijgen voor het testen bij verslaafden." Voor de DEC blijft de vraag staan: Waarom is het noodzakelijk deze dierproeven uit te voeren? De DEC ziet graag dat dit verder onderbouwd wordt, geef informatie over waarom dit niet in mensen kan worden gedaan. De bijwerkingen en dosis zijn immers al bekend. Graag ziet de DEC dat men hierbij verwijst naar een formele opvatting van een METC, die zegt dat dierproeven noodzakelijk zijn om een onderzoek met artesimine op mensen te kunnen starten. 2. Men geef aan "onthoudingsverschijnselen treden in deze dierproef niet op". Als de dieren niet echt verslaafd zijn, hoe is dit dan translationeel naar de patiëntenpopulatie? 3. Men geeft aan dat er al middelen zijn voor nicotineverslaving. Als er al een middel is voor nicotine, Waarom is er dan nog een ander middel nodig? Welke andere aspecten bevat dit nieuwe middel?*
- Datum antwoord: 02-06-2020
- Strekking van de antwoord(en): *1. Ik heb begrepen dat de DEC de METC-5.1 lid2h inmiddels al heeft geraadpleegd, maar dat daar geen eensluidend oordeel op is gekomen. Ik heb naar aanleiding hiervan contact gezocht een klinisch farmacoloog, hij vertelde me dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU. Helaas is in de EU geen artemisinine derivaat geregistreerd als een op zichzelf staand medicijn en zijn PO-formuleringen nog niet beschikbaar. Toch kan een proof-of-concept in een dierstudie de tijd en moeite die nodig is voor goedkeuring en implementatie van menselijke behandelingsprotocollen sterk verminderen. 2. Het optreden van onthoudingsverschijnselen wordt niet langer beschouwd als een voorwaarde voor substance use disorder/verslaving zoals geformuleerd in de DSM-5. Er lijkt ook geen relatie te bestaan tussen de ernst van de onthoudingsverschijnselen en het verslavende effect van een middel. Zo zijn de onthoudingsverschijnselen van nicotine relatief mild en die van opiaten behoorlijk sterk. Toch blijkt uit veel studies dat nicotine minstens zo verslavend is als heroïne. In onze studies richten we ons dan ook op de motivationele component en op cue-activiteit (craving), omdat deze parameters een grotere voorspellende waarde hebben voor terugval in verslavingsgedrag dan onthouding. 3. Momenteel is varenicline (Champix) het meest effectieve medicijn voor nicotineverslaving. Dit medicijn bleek effectief te zijn bij 30% van de gebruikers (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). Alle andere medische therapieën (bijv. Bupropion, nicotinevervanging) bleken minder effectief te zijn.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

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

*Tijdens de eerste behandeling van de aanvraag door de DEC is de DEC tot de conclusie gekomen dat de noodzaak van de voorgestelde dierproeven voornamelijk onvoldoende onderbouwd is en waarom het alternatief namelijk het direct testen van het middel op mensen niet mogelijk is. De DEC besluit dat de aanvraag en de beantwoording van vragen vanuit de DEC tot dusver onvoldoende handvatten biedt om van de urgentie van het proefdieronderzoek te overtuigen en dat daarom het maken van een afweging nog niet mogelijk is. De DEC heeft navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.*

*De vraag van de DEC luidde: “..of deze dierproeven noodzakelijk zijn voor de goedkeuring door een METC of dat een geregistreerd geneesmiddel voor andere doeleinden in beginsel al direct in een klinische trial in mensen kan worden getest?”*

*Het antwoord van de externe METC luidde: “In antwoord op uw vraag: Bij een first-in-human clinical trial van een nieuw geneesmiddel moeten resultaten van dierproeven inzicht geven in de veiligheid en de werking/effectiviteit van het middel. Als een geneesmiddel al geregistreerd is, zijn gegevens omtrent veiligheid (zowel pre-klinisch als klinisch) bekend. Als het middel vervolgens voor een andere toepassing wordt getest dan waarvoor het geregistreerd is dient naar mijn mening een afweging gemaakt te worden. Op de eerste plaats dient een onderbouwing gegeven te worden waarom men verwacht dat het (geregistreerde) middel effectief is bij de nieuwe indicatie. Dit kan zijn op basis van het werkingsmechanisme van het middel (theorie), toevallige waarnemingen gedaan bij klinische toepassing van het middel (empirisch), maar ook uit resultaten van proefdieronderzoek. Daarnaast dient men rekening te houden met de belasting/eventuele risico's van de uit te voeren klinische trial. Gaat het om een eenmalig toediening van een middel of moet dit gedurende langere tijd gebruikt worden. Daarbij dient men een inschatting te maken hoe groot de kans is dat bijwerkingen optreden. Ik stel me voor dat voor een eenmalige toediening van een middel (in een gebruikelijke dosering) geen extra informatie uit proefdieronderzoek nodig is. Bij een middel met grote kans op bijwerkingen of dat langdurig gebruikt gaat worden geeft proefdieronderzoek meer onderbouwing voor een afweging van de benefit/risico verhouding van de trial. Samengevat: medisch-ethisch gezien zijn dierproeven niet strikt noodzakelijk, maar voor goedkeuring door de METC dient wel een goede onderbouwing voor de veiligheid en effectiviteit gegeven te worden”.*

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

- 1. Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
- 2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
- 3. De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
- 4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project).*

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

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk hierbij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapolatiebaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.*



*Na navraag van de onderzoekers bij een klinisch farmacoloog blijkt dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU.*

*Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.*

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming): *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is om te onderzoeken of het middel artemisinine een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden.*

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het directe doel van deze studie is te onderzoeken of het middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen is verslaving.*

*Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende compulsieve drang om het (stimulerende) middel te gebruiken ondanks het feit dat de gebruiker zich bewust is van de schade die het berokkent. Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkels. De huidige medicamenteuze behandelingen tegen verslaving zijn onvoldoende effectief. In dit onderzoek onderzoekt men de effecten van de werkzame stof artemisinin, in het kader van een mogelijke behandeling van verslaving, zowel gebruik als terugval.. De basis voor dit doel is gelegen in aanwijzingen dat artemisinin kan interfereren in het mechanisme van GABAerge neurotransmissie waarvan bekend is dat het een rol speelt in verslaving.*

*Het uiteindelijke doel van deze studie is om nieuwe (aangrijpingspunten voor) medicatie te ontdekken die verslavingsgedrag zullen onderdrukken, en daarmee de lasten voor de maatschappij verlichten. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn de: proefdieren, de onderzoekers en de verslaafde patiënten, de maatschappij. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast en de dieren zullen ingrepen en handelingen ondergaan die ongerief veroorzaken. De waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: Het project kan gezien worden als een proof of concept onderzoek en kan in zeer beperkte mate tot meer fundamenteel-wetenschappelijke kennis leiden. De waarden die voor patiënten bevorderd worden: De preklinische diermodellen zullen de weg naar nieuwe behandelstrategieën voor humane*

*toepassing verkleinen en in de toekomst de gezondheid van patiënten (verslaafden) verbeteren, dit heeft een positieve invloed op de maatschappij.*

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*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. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met collega's in de academische wereld en andere instituten.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Het project bevat 1 appendix. Er is een duidelijk keuzemoment ingebouwd, pas wanneer er een duidelijke effectiviteit van artemisinin wordt gevonden in de eerste experimenten (nicotine) of tweede serie experimenten (opioïde) zal men verder gaan met de vervolggexperimenten. Dit is voor de DEC een belangrijk gegeven gezien de, in de ogen van de DEC, zwakke wetenschappelijke onderbouwing van de geclaimde interferentie van artemisinin van het GABAerge systeem in neuronen. Alleen indien er duidelijke aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam is, is naar opvatting van de DEC vervolgonderzoek zinvol; de ingebouwde beslispunten geven deze garantie.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, kennis kan worden verkregen over verslavingsgedrag. De nieuw verkregen inzichten kunnen op lange termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving aan nicotine en opioïden. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er wordt adequate verdoving/pijnbestrijding toegepast. De dodingsmethode is volgens de bijlage IV richtlijn.*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de



eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU.

*Na de operatie worden de dieren alleen gehuisvest (voor ongeveer 10 weken). Dit is nodig vanwege mogelijke interferentie met de hechtingen, katheter en intracraniële canule na de operatie, door de ratten in dezelfde kooi.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geëvalueerd. Licht uw beoordeling toe.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geëvalueerd.*

*Alle dieren (100%) in deze projectaanvraag ondergaan naar verwachting matig ongerief. Matig ongerief ontstaat als gevolg van de operaties (plaatsen van katheter en intracraniële canule) en door het individueel huisvesten. Licht ongerief ontstaat als gevolg van zelf-administratie van nicotine of opiaten tijdens de gedragstesten. Daarnaast zorgen de injecties, infusies en het doden voor licht ongerief.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal onder andere worden aangetast door de operaties, individueel huisvesten, zelf-administratie van verslavende middelen en het doden van de dieren aan het eind van de proef.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd en er is goed ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.*

*De criteria zijn hieronder weergegeven:*

- Verlies van lichaamsgewicht:  $\geq 15\%$  in een periode van 24 uur
- Onbeweeglijkheid
- Slechte vachtconditie: tekenen dat de rat niet de vacht verzorgd, wat meerdere dagen aanhoudt
- Tremoren / convulsies: door beschadigde intracraniële canule
- Zelfbeschadiging: na een operatie of als gevolg van effecten van heroïne of artemisinin
- Abnormale lichaamshouding: elke indicatie dat de rat een blessure heeft opgelopen waardoor hij gedurende langere tijd niet in staat is zijn normale lichaamshouding te behouden

*De kans dat de dieren een humaan eindpunt bereiken is kleiner dan 2%.*

### **3V's**

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*Binnen de DEC was discussie of dierproeven nodig zijn wanneer een geregistreerd medicijn off label wordt ingezet voor een andere indicatie. Daarover is extern advies ingewonnen. Bij navraag blijkt dat er in de EU geen geschikt geregistreerd middel is dat alleen de werkzame stof artemisinin bevat. De middelen die op de markt zijn, betreffen combinatiepreparaten en zijn niet orale vorm verkrijgbaar, zie de vragen van de DEC aan de aanvragers. Het was dus in alle waarschijnlijkheid niet mogelijk om met behulp van een reeds voor een andere indicatie geregistreerd medicijn klinische trials bij mensen te doen om de effectiviteit van artemisinin bij verslaving te testen. Tijdens de afweging is dit voor de DEC een groot dilemma geweest of er in het voorliggende geval inderdaad onvoldoende onderbouwing was voor het uitvoeren van een clinical trial en dat hiervoor eerst dierproeven noodzakelijk zijn. In het voorliggende geval is de DEC na het inwinnen van informatie uiteindelijk tot de opvatting gekomen dat dierproeven in alle waarschijnlijkheid een eerste noodzakelijke stap zullen zijn voorafgaand aan een clinical trial (zie ook dilemma). Bovendien bleek na beantwoording van de vragen dat er op dit moment ook nog geen overtuigend wetenschappelijk bewijs is dat artemisinin werkzaam zou zijn bij verslaafde patiënten. De DEC onderschrijft de route dat het onderzoek wordt dus ingezet om eerste een proof-of-concept bij dieren te verkrijgen, waarna mogelijke klinische trial bij mensen een volgende stap zou kunnen zijn. Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.*

*De keuze voor het gebruik van rat modellen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Het gebruikte diermodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. De rat is de meest gebruikte diersoort voor dergelijke verslavingsexperimenten, zodat een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk is.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats, de vervolggexperimenten zullen alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 448 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

*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.*

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd. Mochten er onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt het experiment onmiddellijk beëindigd en het dier gedood.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: *n.v.t.*

### **Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef**

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

*Men zal tijdens dit onderzoek dieren van beide geslachten gebruiken.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

*Voor de analyse van weefsel is het nodig de dieren te doden. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.*

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

### **NTS**

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

*De niet-technische samenvatting is na de aanpassing een evenwichtige weergave van het project. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

*Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over of de stof artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden het gebruik van 448 ratten in deze dierproef die daarvan matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale

en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot aanzienlijk nadeel voor deze proefdieren. De waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden zijn: beperkt voordeel vanwege de kennisontwikkeling en het mogelijk ontwikkelen van een proof-of-concept. Deze kennis kan ook gebruikt worden in andere wetenschapsgebieden zoals verslavingsonderzoek. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van nicotine en opioïden verslaving. De huidige mogelijkheden hiervoor zijn beperkt.*

*De DEC is van mening dat de lange termijn belangen van de patiënten (en de samenleving) in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 448 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden en tijdens de proef matig ongerief ondervinden.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over hoe artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over en geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving, is afgewogen tegen het, als matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 448 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over of artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Inzichten in het mogelijke werkingsmechanisme zullen niet worden verkregen.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende behandelstrategieën zullen worden ontwikkeld. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat naar het oordeel van de DEC het, als substantieel te kwalificeren, maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het gebruik van maximaal 448 ratten en het daarbij verwachte matige ongerief.*

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.*

*Eén lid gaat niet mee. Dit lid is van mening dat het beginnen met verslavende middelen een keuze is die de mens zelf doelbewust maakt. Tevens is zij van mening dat terugvallen in verslaving ook met alternatieven aan te pakken is en dat nieuw onderzoek met proefdieren niet nodig is. Het ongerief bij de dieren weegt voor dit lid niet op tegen de belangen van het onderzoek. Een tweede lid schaart zich achter het meerderheidsstandpunt maar is van opvatting dat de gepresenteerde wetenschappelijke onderbouwing waarom artemisinin een rol zou kunnen spelen in verslaving niet erg overtuigend is; echter de ingebouwde beslismomenten geven voor dit lid voldoende garantie dat er geen verdere proeven worden gedaan indien blijkt dat er geen resultaten zijn die op effectiviteit wijzen.*

*De andere leden zijn van mening dat de belangen van het onderzoek opwegen tegen het maximaal matig ongerief dat teweeg wordt gebracht bij de dieren, maar onderkennen wel de hierna volgende dilemma's.*

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*De DEC heeft bij de beoordeling van dit project wel een dilemma geconstateerd. Enerzijds het doen van onderzoek naar mogelijke behandelmethoden van verslaving, waarvoor dierproeven worden gedaan, en anderzijds de 'vrije wil' om te beginnen met het gebruik van verslavende middelen. Verslaving aan nicotine en opioïden is een maatschappelijk vraagstuk, waarbij men, in het algemeen, begint te gebruiken uit 'vrije wil'. Echter het is duidelijk dat er niet bij iedereen sprake is van een 'vrije keuze'. Denk hierbij aan adolescenten, mensen die een verhoogde neiging tot impulsiviteit en compulsiviteit hebben of lijden aan een psychiatrische stoornis zoals schizofrenie. Ook spelen sociaal-economische factoren een rol bij het ontwikkelen van en het afkomen van een verslaving. Bij kwetsbare groepen en gevoelige mensen kan een behandeling noodzakelijk zijn om definitief van een verslaving af te komen, daaraan kan dit onderzoek op termijn een bijdrage leveren. Het is duidelijk dat ook preventieve maatregelen een rol moeten krijgen: Het is de taak van ouders en de overheid om ervoor te zorgen dat deze kwetsbare en gevoelige mensen niet in aanraking komen met dergelijke verslavende middelen. Door maatregelen te nemen zou het doen van onderzoek met dierproeven, om een behandeling tegen verslaving te vinden, wellicht minder noodzakelijk zijn. Omdat nicotine overal vrijelijk te verkrijgen zijn voor mensen ouder dan 18 jaar, én er op dit moment onvoldoende inzicht is in alle kwetsbare groepen, is er geen basis om dit vanuit de overheid gestalte te geven met afdoende preventieve maatregelen. Dit geldt echter niet voor opioïden.*

*Een ander vraagstuk is het doen van dierproeven met werkzame stoffen die reeds als geregistreerd medicijn (voor andere indicaties) op de markt zijn. Er lijken geen duidelijke richtlijnen te bestaan voor de vraag of het bij het off label toepassen van medicijnen het wettelijk, medisch of ethisch noodzakelijk is om eerst dierproeven te doen. Wanneer de veiligheid van een middel reeds is bewezen bij de registratie van het geneesmiddel, dan zou het middel in principe (met informed consent) ook direct ingezet kunnen worden in clinical trials voor mensen en kunnen (nieuwe) dierenproeven wellicht*

*achterwege blijven. Om een overwogen besluit te kunnen nemen zou een samenspraak met een METC noodzakelijk zijn, om het alternatief, een voorstel voor een clinical trial, te onderzoeken en om op basis daarvan de conclusie te kunnen trekken, namelijk dat er voor de dierproeven al of niet een alternatief beschikbaar is.*



## Form

### Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Evaluation of artemisinin on the addictive properties of addiction nicotine and opioids

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Addiction is a chronically relapsing condition that exerts a significant personal and financial cost to society. One of the most commonly abused *legal* drugs, nicotine, is responsible for a significant



proportion of this cost to society with yearly 20.000 deaths in the Netherlands with more than 2 million daily smokers. Another major concern in addiction care is the recent opioid crisis in the United States (US). Although non-medical opioid use has been declining in the Netherlands, medical prescription of opioid-painkillers (over 1 million in the Netherlands) poses a major threat to health. In 2017, more than 70,000 people died from drug overdoses in the United States, making it a leading cause of injury-related death. Of those deaths, almost 68% involved a prescription or illicit opioid. Therefore, opioid and tobacco use disorder are significant risk factor for premature death and disabilities.

Although the choice to try a drug for the first time is voluntary, it can be influenced by external factors such as peer pressure, price, and, in particular, availability. Nonetheless, most people exposed to drugs do not develop addiction. At some point after continued repetition of voluntary use, the ability to control its use is lost in a subset of people. At that point, there is a compulsive, often overwhelming involuntary aspect to continue nicotine and opioid use. Most importantly, short term (weeks to months) control over nicotine and opioids appears to be possible, but given enough time relapse invariably occurs after a period of abstinence.

Recent advances in our understanding of brain function have led to the conclusion that addiction is a biological disorder, in the same manner as other psychopathologies (Dackis & O'Brien, 2005, *Nat Neurosci.*). Just as a patient suffering from depression should not be told "snap out of it, just be happy", a patient suffering from substance use disorders cannot just "choose to stop taking drugs". Instead, the patient is in need of help and proper treatment to remain abstinent. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5) lists several criteria for a diagnosis of 'substance use disorder'. Whilst there are various factors which can lead to presentation with these symptoms, the key impediment to treatment is relapse. Relapse is a seemingly inevitable outcome, despite stated intentions to remain abstinent. What then, are the causes of relapse? Learned associations play an important role in nicotine and opioid addiction. With repeated drug use, the effects become associated with stimuli or cues in the environment, such as packaging, contexts, and people (Wikler, 1973, *Arch. Gen. Psychiatry*). These memories are notoriously difficult to remove, and they persist during abstinence long after cessation of opioid or nicotine use. Cues that are associated with opioids and nicotine are a key trigger for relapse, and thus critical for maintaining the cycle of opioid and nicotine addiction (Siegel, 1999, *Addiction*). Drug cues can be classified as discrete or contextual. Discrete cues are objects or sensory stimuli that are directly paired with the consumption of the drug, also referred to as drug paraphernalia. Contextual cues refer to the environment/context in which drug consumption takes place. Another factor that can trigger a relapse in abstinent drug users is re-exposure to the drug itself. A small amount of the drug taken after prolonged abstinence often causes strong craving and a so-called drug-induced relapse. There is considerable evidence that the effects of drug priming, discrete and contextual cues on drug seeking are mediated by partly distinct neural substrates (Bossert et al, 2013, *Psychopharmacology*). Treatment strategies for addiction focus on prevention of relapse, but to date these medications have limited efficacy. In this project we propose to evaluate the effects of a medication (that is used worldwide as a treatment for malaria and also as an anti-cancer drug) on the addictive properties of nicotine and opioids. We believe this drug has potential anti-addiction properties based on its actions on GABA receptors. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the CNS and exerts its effects through activation of GABA-A and GABA-B receptors. There are several lines of evidence showing that GABA signalling and in particular through the GABA-A receptor (GABAAR) is disturbed in addiction. Our own research has shown, using a rat model of nicotine addiction, that exposure to nicotine-associated cues (evoking relapse behaviour) resulted in a rapid increase in the availability of GABA-A receptors in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). Manipulation of the trafficking of these GABA-A receptors revealed that GABA-A receptors mediate an inhibitory effect on nicotine relapse and that further activation of GABA-A receptors in the dmPFC with the GABA-A receptor agonist muscimol strongly reduced the propensity to relapse upon exposure to nicotine cues. These results are in line with observations from human imaging studies that metabolic activity in the anterior cingulate cortex (ACC, the human equivalent of the dmPFC in rats) is strongly correlated with craving in human addicts (Volkow and Baler, 2014, *Neuropharmacology*) and studies showing reduced levels of GABA in the ACC of addicted subjects (Prescot et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*; Abé et al, 2013, *Drug Alcohol Depend.*) Variations in GABAAR also play a significant role in impulsivity traits that are related to drug abuse



(Stephens et al, 2017, Genes, Brain Behav.). In humans the GABAAR gene subtype has been linked to a variety of clinical disorders characterized by a lack of impulse control and pharmacological activation of GABAAR reverses increased impulsivity and high alcohol consumption in rats (Gondré-Lewis et al, 2016, Stress). Finally, the neurotransmitter dopamine (DA), a critical moderator of addiction behaviour has recently been shown to act as a direct modulator of GABAAR, in particular of GABAA receptors carrying the  $\beta 3$  subunit (Hoerbelt et al, 2015, J Neurosci.). It has been postulated that high concentrations of DA (resulting from drug exposure) may result in a disrupted DA-GABA relationship in the brain. All these lines of evidence lead to the hypothesis that enhancing GABA-A transmission may have therapeutic value in the treatment of drug addiction.

There are several registered medications that enhance GABAAR-signalling, such as very recently shown for the natural occurring anti-malarial drug artemisinin (Klayman, 1985, Science). Artemisinin not only (a) enhances GABAAR signalling (Berishvili, 2017, Cell); (b) but also affects the GABAAR $\beta 3$ -subunit (its effects on GABAAR signalling are counteracted by the  $\beta 3$ -GABAAR antagonist picrotoxin (Berishvili, 2017, Cell); (c) and has antinociceptive effects. The antinociceptive (pain-killing) effects of artemisinin are also mediated by activation of GABAAR (Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). This is of particular interest as the antinociceptive and reinforcing effects of opioids are also mediated through GABA neurotransmission. As such, artemisinin may directly interfere with the effects of opioids.

Importantly, artemisinin at clinically relevant doses is in general well tolerated with mild adverse reactions such as nausea, reduced appetite, vomiting in >10% of humans (Klayman, 1985, Science), also within its application in oncology (Slezakova and Ruda-Kucerova, 2017, Anticancer Res.). This is in contrast to most GABAAR agonists, including benzodiazepines, which have limited clinical utility because of sedative side-effects, dependence, tolerance and withdrawal (Fischer, 2017, CNS & Neurological Disorders).

Therefore, we postulate that artemisinin is a relatively safe and promising candidate for the treatment of opioid and nicotine addiction. Our studies will be a first step towards clinical evaluation of artemisinin in addiction treatment. Positive results will be used to design a first clinical trial in collaboration with addiction psychiatrists and treatment centers in the Netherlands. It is important to note that this is the first attempt to evaluate the potential anti-addiction properties of artemisinin. If a positive Proof-of-Concept outcome will be obtained in animals, we hope to get approval for testing in humans.

We have chosen to focus on both nicotine and opioids use in the same project. There is increasing evidence in the literature that different drugs of abuse act on different neurobiological mechanisms. Therefore, in this project we will use the same pharmacological approaches to study addiction to two different drugs of abuse. This will allow us to identify similarities and differences in the neurobiological substrates of addiction to these two drugs. Based on the literature and our own studies we speculate that artemisinin will reduce the reinforcing value of opioids and reduce cue-induced relapse to these drugs. We will use heroin as the opioid of choice in our experiments as we have ample experience with this drug in our animal models. It is important to note that opioids like heroin and the medically approved morphine, fentanyl and oxycodone, all exert their primary action through activation of the same mu-opioid receptor.

### 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 **main objective** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin-self-administration and relapse.

Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. **For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This**

drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.
2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?
3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?

This would be the first study to evaluate artemisinin as a potential anti-addiction treatment. Given the strong predictive value of our models, positive results would be a major first step in the development of novel pharmacotherapies to treat tobacco and (prescription) opioid addiction and potentially other addictions.

We have budgeted 5 years for this project because each of the behavioral experiments takes approx. 3 months to complete. We have strong experience in the operation of behavioral experiments looking at self-administration and relapse. Furthermore, we have experience using the proposed methodology for intracranial infusions of drugs that are crucial to increase our understanding of the neural mechanisms and substrates of relapse.

Our facility has an adequate number of operant chambers, housing facilities, and full-time staff to complete all of these experiments within the 5-year time-frame of the protocol. Furthermore, all of the equipment is already present.

---

### 3.3 Relevance

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

In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.

In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world ([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf)). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017.

Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. **An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols.** Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.

### 3.4 Research strategy

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

The **overarching aim** of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.

We are using well validated animal models of i.v. self-administration and relapse. These models allow us to evaluate effects of artemisinin on (a) the reinforcing properties of heroin and nicotine, (b) on the motivational properties of both drugs (using progressive ratio schedules of reinforcement) and (c) on cue-, context- and drug-induced relapse.

Although our main focus is on relapse prevention, it is important to also evaluate artemisinin effects on other behavioural readouts (e.g. drug consumption and the motivation to take drugs) to obtain a full picture of the potential therapeutic value of this compound and the underlying mechanisms.

##### First series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse. Doses of artemisinin will be based on recent literature showing antinociceptive effects in a dose range of 2.5 – 10 mg/kg following i.p. administration. These effects were blocked by a GABA-R antagonist, providing evidence that they were mediated through activation of GABA-A receptors. Therefore, we will use a similar dose range in our experiments. We will use a between-subject design (3 groups) to study the effects of 0, 3 and 10 mg/kg i.p. of artemisinin on cue-, context- and drug-induced relapse to heroin and nicotine seeking in 4 separate experiments.

##### Second series of experiments:

Here we evaluate the acute effects of artemisinin on drug consumption and on the motivation to use heroin and nicotine.

In case of nicotine; experiments will only be performed if the first series of experiments show a reduction in either cue-, context- or drug-induced relapse.

In case of heroin; given the fact that both artemisinin and opioids exert their effects directly or indirectly through GABA-A signalling, we speculate that the reinforcing effects of heroin will be affected by artemisinin. Therefore, regardless of the outcome of the relapse studies (that are performed under heroin-free conditions), we will conduct these experiments.

We will use a within-subject design to test 3 doses of artemisinin on heroin (or nicotine) self-administration under a fixed ratio schedule of reinforcement and under a progressive ratio schedule of reinforcement. The latter schedule is designed to measure the motivational properties of drugs.

##### Third series of experiments:

If positive effects on relapse are observed in our first series of experiments, we will here evaluate artemisinin in a more clinically relevant dose regimen (go/no go moment). In clinical settings medical treatment usually occurs with chronic treatment protocols where medication is taken for several weeks or months. In order to evaluate whether prolonged treatment with artemisinin will reduce the propensity to relapse, animals will receive daily injections of artemisinin during the 3 weeks abstinence phase of the self-administration – relapse protocol. We will use a between subject design with 2 groups. The dose of artemisinin will be based on the outcome of the first series of experiments.

##### Fourth series of experiments:

In a final set of experiments, we will test our hypothesis that the relapse-attenuating effects of artemisinin are mediated in the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC). To that end, animals will be implanted with guide cannula directed at the dmPFC, allowing intracranial infusion of artemisinin prior to the relapse test. These experiments will only be performed after a positive result on relapse in the first series of experiments (go/no go moment).

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.

**Surgeries:**

All rats will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will (in the same surgical session) also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

**Artemisinin treatment:**

In the first series of experiment we will evaluate the acute effects of artemisinin on relapse behaviour. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per relapse test and each rat will be tested twice. In second series we will evaluate the acute effects of artemisinin on the reinforcing and motivational properties of heroin and nicotine. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 mg/kg, ip) per test and each rat will be tested 6 times. In the third series of experiments we will evaluate the chronic effects of artemisinin on relapse. Rats will be injected daily with artemisinin or vehicle for 20 days. In the fourth series of experiments we will evaluate the acute intracranial (dmPFC) effects of artemisinin on relapse. Each rat receives 1 out of 3 doses: 0 (vehicle), 3 or 10 µg) per relapse test and each rat will be tested twice.

**Behavioural task:**

The self-administration - relapse model consists of a **self-administration phase** during which responding on a lever results in the i.v. infusion of a drug (heroin or nicotine).

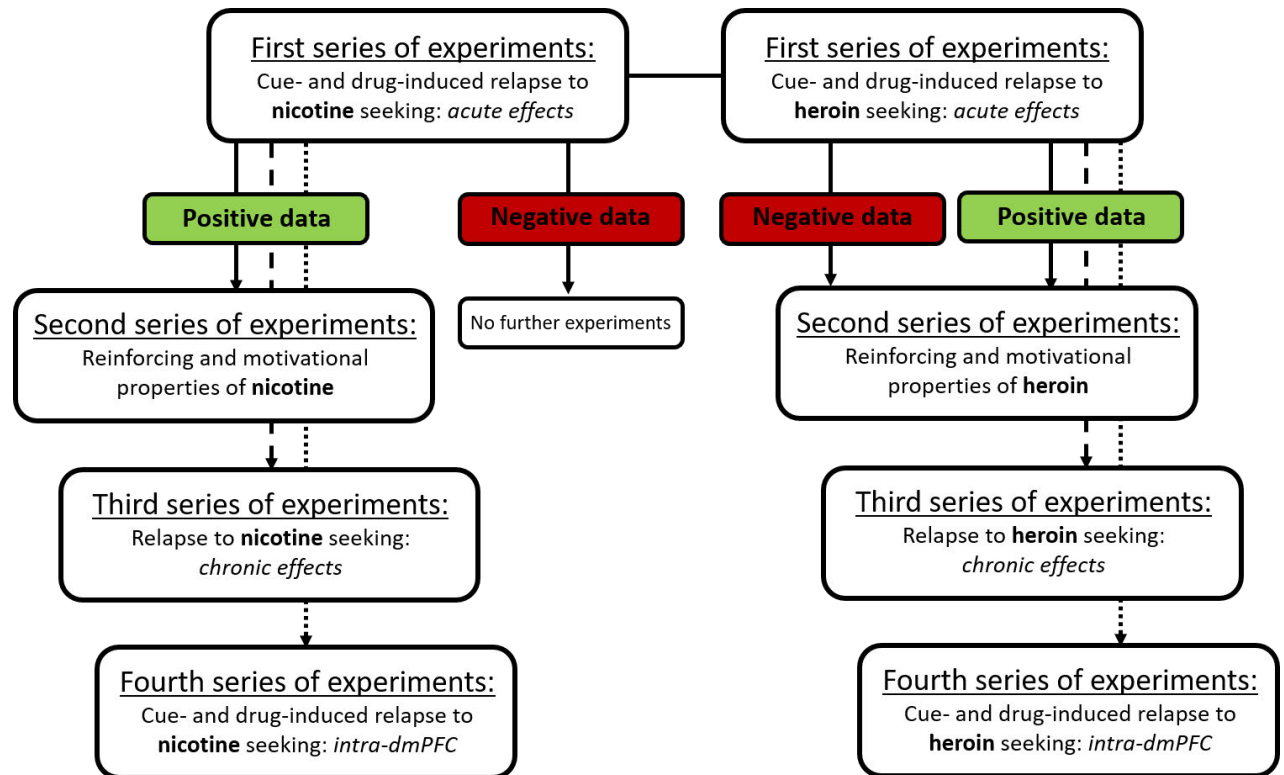
In a cue-induced relapse experiment a 5 second tone/light stimulus (discrete cue) is presented during the infusion. In some experiments, animals will be subjected to a progressive ratio schedule of reinforcement, tailored to measure the motivational properties of the drug. During a progressive ratio schedule, the number of lever presses needed to obtain an infusion of the drug will be progressively increased until a so-called breakpoint is reached. The self-administration phase is followed by an **extinction phase** during which responding for the drug will be extinguished. During this phase, lever presses do not result in drug delivery and presentation of the discrete cues. Subsequently, a relapse is provoked by re-introducing the discrete cues and the ability to respond for these cues. No drug is delivered during the relapse test. After the **cue-induced relapse test**, the discrete cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test. Previous work has indicated that drug-induced relapse is more robust in the presence of previously extinguished drug-associated cues.

In **context-induced relapse experiments**, rats will be randomly assigned to one of two different contexts. These contexts differ in **auditory** (white noise (70 dB), either continuous or interval (5 s on, 5 s off)), **olfactory** (either lemon-scented or almond-scented odour) and **tactile** cues (chamber floor: a flat PVC surface with either holes or straight grooves). The extinction phase takes place in the other context. During daily sessions in a distinct context and without drug delivery responding for the drug will be extinguished. Context-induced relapse is then tested by placing the rats again in the drug-associated (training) context with no drug delivery. After the context-induced relapse test, the drug cues will be extinguished in daily extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced relapse test.

We will evaluate the effects of artemisinin on the different parameters of the behavioural task: on drug self-administration, progressive ratio responding and cue-, context- and drug-induced relapse.

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

The study as a whole is designed to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse. For each series of experiments, there are specific decision points that will guide future experiments.



Outline of decision points where rats will be used or not depending on the outcome of experiments.

The first series of experiments focus on the acute effects of artemisinin on cue- (discrete and context) and drug-induced relapse of nicotine and heroin seeking. Based on our previous work and that by others we hypothesize that artemisinin will be effective in reducing relapse to nicotine. If so, we will continue with the second, third and fourth series of experiments. If not, no further experiments with nicotine will be performed. In parallel, we will investigate the acute effects of artemisinin on relapse to heroin seeking. Again, positive effects will lead to the second, third and fourth series of experiments. If the first series of experiments with heroin yield negative results, we will still conduct the second series of experiments with heroin. This is because GABA-AR activation by artemisinin may directly interfere with the reinforcing effects of heroin. However, third and fourth series of experiments with heroin will not be performed in that case.

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	Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 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.

**Behavioral approach:** We use a rat self-administration-relapse model to study the modulatory role of Artemisinin on heroin and nicotine self-administration, motivation, and cue-, context-, and drug-induced relapse.

##### Description of the general design for behavioural training:

Separate groups of adult male and female rats will be trained to self-administer nicotine or heroin in the presence of a discrete compound (tone + light) cue and/or contextual cues. Nicotine and heroin will be administered through an intravenous (i.v.) catheter. After training, animals will be subjected to an extinction phase, during which drugs and cues are not available. After this phase we will test the animals for cue-, context- and drug-induced relapse.

##### Outcome parameters:

1. Self-administration and dose response: Responses on the active lever are reinforced with nicotine or heroin infusion and associated with a 5-s cue presentation. Responses on the inactive lever are monitored but have no consequences. They serve as a discrimination index. We continue self-administration until animals have adequately learned to perform the response. As response rates are typically low for drugs like nicotine and heroin on a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement (1 lever press results in 1 infusion) we increase (following stable responding on FR1) the ratio to FR2 and finally to FR3. Subsequently, we will test the acute effects of artemisinin on responding for two different doses of nicotine or heroine. Read-out parameters

are: 1) the number of active levers presses and 2) the number of rewards (drug infusions) earned during the test session.

2. Motivation: here we determine the motivation to self-administer nicotine and heroin by introducing a progressive ratio schedule of reinforcement. During 4-hour sessions the number of active responses leading to one infusion will increase along the following equation: response ratio =  $5 \times e^{(0.2 \times \text{infusion number})} - 5$ , rounded to the nearest integer. Subsequently, we will test the acute effects of artemisinin on the motivation to self-administer nicotine or heroin. Read-out parameters are: 1) the final completed ratio and 2) the total active lever presses during the test session.
3. Extinction phase: In this phase lever presses do not result in drug delivery. During this phase responding on the active lever will be extinguished which is necessary to prepare the animals for the relapse tests.
4. Relapse tests: We test the ability of discrete cues (5 second tone/light stimulus), contextual cues (auditory, olfactory and tactile cues) or the previously self-administered drug (nicotine or heroin) to reinstate drug seeking. This is a relapse test. During the test, we record responses on the active lever, but no drug is delivered. The total active lever presses will be taken as readout for relapse vulnerability. We will test the acute and subchronic effects of artemisinin on relapse vulnerability.

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

Each rat will undergo surgery to implant the jugular vein catheter for i.v. nicotine or heroin self-administration. In the fourth series of experiments, rats will (during the same surgical session) also be placed in a stereotactic frame for intracranial implantation of guide cannula directed at the dorsal medial prefrontal cortex.

The rats will be given minimum 1 week to recover prior to starting the self-administration phase. During the surgery we will provide adequate anaesthesia and analgesia. After surgery we will monitor weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc., for a week.

In general, rats need approximately 10-12 daily sessions to learn the self-administration procedure on the FR1 schedule, they are then switched to an FR2 for 3-4 sessions and finally to FR3 for another 4-5 sessions.

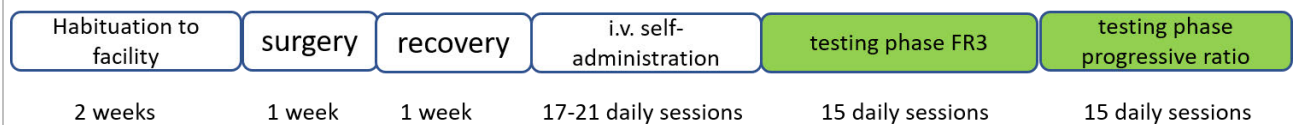
In the **first series of experiments**, after the FR3 schedule, animals (3 groups of 14 rats for each experiment) move to the extinction phase during which responding for the drug will be extinguished. This will be done in 13-17 daily sessions. Subsequently, animals will be tested on cue- or context-induced relapse in a 60-min session. Each animal will be tested once and receives one of the three doses (0.0, 3.0 and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min-prior to the test. This time-interval is based on previous studies showing dose-dependent effects on antinociception using a similar time-interval (e.g. Dehkordi et al, 2019, Korean J Pain). Subsequently, responding for the cues will be extinguished in an additional series of extinction sessions to prepare the animals for a drug-induced reinstatement test. In general, 10 - 12 extinction sessions are sufficient. After that animal will be tested for drug-induced relapse. To that end, animals will receive a s.c. injection of either nicotine (0.15 mg/kg) or heroin (0.25 mg/kg) and are placed in the test chamber for 60 min. In addition, each animal receives one of the three doses (0, 3-and 10 mg/kg i.p.) of artemisinin 30 min prior to the test. For that, animals are randomized to new experimental groups to minimize carry-over effects of the previous test.

Habituation to facility	surgery	recovery	i.v. self-administration	extinction	cue- or context-induced relaps	Cue or context extinction	drug-induced relapse
2 weeks	1 week	1 week	17-21 daily sessions	13-17 daily sessions	1 session	10-12 daily sessions	1 session

Total duration is approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

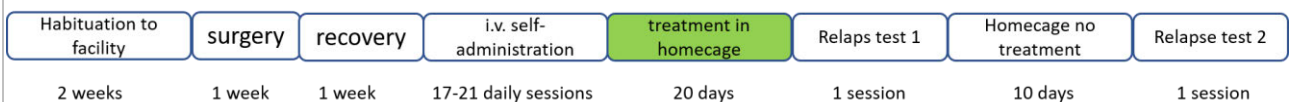


In the **second series of experiments** we will test the effects of artemisinin on the reinforcing and motivational effects of heroin and nicotine. To that end, a group of 16 rats for each experiment will be used in a within-subject design. Training phase will be similar to the first series. Rats will then be tested on the FR3 and on the progressive ratio schedule of reinforcement at two i.v. doses of nicotine (40 and 10 µg/kg/inf) or heroin (100 and 25 µg/kg/inf) and at the three doses of artemisinin (0.0, 3.0 and 10.0 mg/kg i.p.). Progressive ratio sessions end after 4 h or after 1 h without earning a reward, whatever comes first. The Test (artemisinin) sessions (12) will be performed two times a week on Tuesday and Friday. Regular self-administration sessions will be performed on the days between.



Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **third series of experiments** study the effects of chronic treatment of artemisinin on relapse to heroin or nicotine seeking. Here we will test a more clinically relevant treatment protocol, in which artemisinin is given daily during the abstinence phase. To that end, animals (2 groups of 14 rats for each experiment) will be trained for nicotine or heroin self-administration up to an FR3 schedule of reinforcement. Subsequently, animals will be treated daily with artemisinin (at a dose that was found to be effective in the first series of experiment) or vehicle. In a previous study by others a dose regimen of 5 mg/kg i.p. once daily was found to be effective in reducing neuropathic pain over a period of 13 days (Ying et al, 2017, Neurochemistry International. In this particular experiment, rats will not be subjected to an extinction phase, to avoid a possible interference of artemisinin with the extinction learning process. Instead, after 20 days of artemisinin treatment in the home cage animals are placed in the training boxes for a more general relapse test of 60 min. During the test, there is no drug delivery, but all drug cues will be present. Animals will be tested again after 10 days to determine whether the treatment has long-lasting effects on relapse vulnerability. During these 10 days artemisinin treatment will be discontinued.



Total duration: approx. 12 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.

Following positive results in the first series of experiments, we will in a **fourth set of experiments** test the effects of intra-dmPFC infusion on cue-, context- and drug-induced relapse to nicotine and heroin seeking. The procedure will be identical to the first series of experiment. The only difference will be that now artemisinin (0, 3 and 10 µg/site) will be bilaterally infused directly into the dmPFC 10 min-prior to the relapse test. We found no previous studies on intracerebral administration of artemisinin. We base these doses on previous experience from our lab and others that in general conversion from mg/kg to µg/site gives a good estimate of pharmacologically effective doses.



Total duration: approx. 13 weeks, including habituation to facility, surgery, recovery and behavioural training. Animals are trained 5 days a week.



Intravenous nicotine and heroin self-administration has been used in this lab for many years, and is considered the most reliable model of drug self-administration in animal models around the world. We have ample experience with the above described procedures.

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

For statistical analysis of the primary outcome measure (lever pressing), we will use ANOVA to determine significant effect between groups and within the animal (post-hoc Student-Newmann-Keuls test) for all behavioural outcomes.

In all experiments, the number of rats we have proposed includes the expected number of rats that will be excluded because of experimental factors. Such as: anatomically misplaced cannula, rats that do not acquire drug self-administration, blockade of i.v. catheter, poor health after surgery, etc. In our extensive experience the maximum exclusion rate is 25%. We need a minimum of 12 rats to be included for statistical analysis as an appropriate number to detect statistically significant effects based on the variability of animal behaviour work. We are using a Wistar outbred strain and have over 25 years of experience with i.v. self-administration protocols using this strain. As such, individual variability in behavioural performance is taken into account in the group sizes.

The first and third series of experiments do not include intracranial guide cannula. Therefore, we expect the exclusion rate to be less than 15%. We will therefore allocate 14 rats per group.

In the second series of experiments, catheter patency is needed for at least 9 weeks. Therefore, we expect the exclusion rate to be about 25%. For these experiments we allocate 16 rats per group.

The fourth series of experiments includes guide cannula implantation. Exclusion rate is estimated at 25%. Therefore, we will allocate 16 rats per group.

## **B. The animals**

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

We will use equal numbers of male and female rats because we do not expect sex to be a critical variable in our studies. Furthermore, the National Institutes of Health (USA) recently mandated equal numbers of male and female subjects in experimental research (because there was a history of bias towards male subjects), therefore we need to use equal numbers to remain consistent with worldwide animal research trends.

We are using rats because they have the cognitive capabilities required to understand the task. Indeed, the rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and heroin addiction. Nicotine and opioid use disorders are complex disorders caused by interactions between the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this it is not possible to study these questions in less complex animals.

The rats will be approximately 12 weeks old when we receive them from the supplier. The experiments will typically take around 3 months to complete from arrival in the animal facility to end of experiment.

The estimated numbers are as follows:

### First series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:

1. Cue-induced nicotine relapse
2. Cue-induced heroin relapse
3. Context-induced nicotine relapse
4. Context-induced heroin relapse

Each experiment includes 3 experimental groups of 14 rats

Total number of rats: **168**

### Second series of experiments

We will conduct 2 separate experiments:  
1. i.v. nicotine self-administration  
2. i.v. heroin self-administration  
Each experiment includes 1 group of 16 rats  
Total number of rats: **32**

Third series of experiments

We will conduct 2 separate experiments:  
1. Heroin relapse  
2. Nicotine relapse  
Each experiment includes 2 group of 14 rats  
Total number of rats: **56**

Fourth series of experiments:

We will conduct 4 separate experiments:  
1. Cue-induced nicotine relapse  
2. Cue-induced heroin relapse  
3. Context-induced nicotine relapse  
4. Context-induced heroin relapse  
Each experiment includes 3 experimental groups of 16 rats  
Total number of rats: **192**

The different decision steps in our study design will lead to the following number of rats used:

Nicotine experiments:

First series: **84** rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, no further experiments (No-Go decision)

Heroin experiments:

First series: 84 rats, if positive: an additional **140** rats for second, third and fourth series (Go decision);  
if negative, second series of experiments: **16** rats (No-Go decision)

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

REPLACEMENT: The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.

REDUCTION: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we

have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.

REFINEMENT: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures. The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.

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

The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

n.a.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

### 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 the surgeries, we will use standard surgical procedure to reduce pain and suffering. Before the start of the surgery we will provide adequate pain relief. After this, we will induce anaesthesia and maintain the anaesthetised state throughout the surgery. Prior to the skin incision, we will inject (subcutaneous) a local anaesthetic into the incision site. After surgery the animal will be monitored for a week (recording weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc.), and analgesia will be administered if necessary.

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

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

1. Animals self-administering drugs through i.v. cannula have a higher risk of infection.
2. Surgeries for the jugular catheter and implantation of intracranial guide cannula will have an impact on the animal's welfare.
3. After the surgical procedures, we will provide single-housing for the rats.
4. The training procedure itself will have an effect.
5. Possible side-effects of artemisinin: Hypoactivity in rats has been observed at doses of 50 and 100 mg/kg artemisinin (Amos et al., 2003; Brain Res. Bull.). The dose range used here is 3 – 10 mg/kg, reducing the likelihood of reduced spontaneous motor activity. Hypoactivity is not reported in humans at clinically relevant doses. More than 10% reports loss of appetite and nausea.
6. The self-administration protocols of nicotine and heroin used here will not lead to physical signs of withdrawal during abstinence.

Explain why these effects may emerge.

1. Animals in the nicotine and heroin self-administration experiments have a higher risk of infection because we have implanted a jugular vein catheter which raises the risk of exposing the venous system to bacterial infections.
2. Because the surgeries involve skin incision and exposing the brain (cannula implantation) there is a risk of infection.
3. We will single-house the rats because there is a risk that shared housing results in opening wounds or destroying catheters/cannula making the animal no longer usable for the experiments.
4. The training procedure itself can impact on the animal because we will be almost daily handling them and placing them in the operant chamber.
5. Tethering the animal to the liquid swivel will cause mild discomfort initially that will reduce as the rat habituates to this experience.

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

1. We will prevent infection by sterilizing all solutions before i.v. infusion.
2. Unfortunately, single-housing is necessary to ensure that i.v. catheters and intracranial cannula stay intact throughout the entire experiment. To minimise the impact of single-housing we will provide adequate environmental enrichment.
3. To reduce the impact of the daily running of the experiments, the rats will only be handled by appropriately trained researchers. Proper handling of the rats significantly reduces the negative impact of handling. We expect the negative effect to reduce as rats habituate to the experimental conditions.
4. Tethering the animal to the liquid swivel will also habituate relatively quickly.
5. Possible side effects artemisinin:
  - hypoactivity: We monitor the number of responses on the inactive lever (not associated with drug delivery) in each session. This gives a good indication of motor impairment induced by experimental compounds.
  - loss of appetite and nausea: animal weight and condition will be monitored throughout the experiment

## 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.

We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:

- Loss of body weight:  $\geq 15\%$  in 24 hour period.
- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage
- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days
- Tremors/convulsions from damaged intracranial canula
- Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin
- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time

Indicate the likely incidence.

< 2%

## K. Classification of severity of procedures

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

Rats in all of the proposed experiments will experience the level of discomfort categorised as 'moderate'. Specifically this will occur at the beginning of the experiments where the surgical procedure will produce moderate discomfort. Following this all animals will undergo the behavioural training which will cause only mild discomfort.

I.P. and intracranial administration of artemisinin (including possible side-effects) prior to testing and s.c. administration of nicotine and heroin to induce relapse is associated with mild discomfort. However, this discomfort will be alleviated by prior handling of the animal and the injections will only be performed by a trained researcher/technician.

Procedures	Categorie mate van ongerief*	Frequentie (interval) en duur van de handelingen	Percentage van dieren
1. Surgeries <ul style="list-style-type: none"><li>- i.v. catheter</li><li>- i.v. catheter and intracranial guide cannula</li></ul>	Moderate Moderate	1x, max. 30 min 1x, max. 40 min	100% Max 43%
2. Behavioural procedures <ul style="list-style-type: none"><li>- i.v. self-administration</li><li>- single housing</li></ul>	Mild Moderate	Range: 34-44 sessions, 5 days a week, 1-4 h Continuous for approx. 10 weeks	100% 100%
3. Injection/infusions <ul style="list-style-type: none"><li>a. Injections (i.p., s.c)</li><li>b. Intracranial infusions</li></ul>	Mild Mild	Range: 3-20x, 1x every 10 days, 1x every 3 days, or daily, max. <1 min 2x, max. <3 min	100% Max 43%
4. Termination under general anesthesia	Mild Non-recovery	Transcardial perfusion	57% 43%

The cumulative discomfort for all rats (100%) is 'moderate'

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals that had intracranial surgery will be killed to verify the correct injection site. Other animals will be killed because they will not be used for other experiments.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving?
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Verslaving, roken, opiaten, hersenen, terugval

### 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
- 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)
- Verslaving aan tabak en aan opiaten is een groot probleem in onze maatschappij; jaarlijks sterven er in Nederland 20.000 mensen aan de gevolgen van roken. Heroïnegebruik komt gelukkig nog maar weinig voor in de algemene bevolking. Het aantal gebruikers van de medische opioïde oxycodon laat echter bijna een verdubbeling zien tussen 2014 en 2018. Dit is een zorgelijk ontwikkeling. Zo kostte opiaatgebruik in de Verenigde Staten in 2017 aan 70.000 mensen het leven. Verslaving wordt gezien als een hersenaandoening. Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende drang om het middel te gebruiken ondanks de enorme schade die het berokkent aan het individu (compulsief gebruik). Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkels. De huidige behandelingen tegen verslaving zijn weinig effectief. In dit onderzoek testen

we de effecten van een middel dat (buiten de EU) al geregistreerd is voor andere medische toepassingen op deze twee belangrijke belemmeringen voor succesvolle behandeling: terugval en gebruik.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Op basis van eerder onderzoek verwachten we dat dit middel de kans op terugval in nicotineverslaving en de verslavende werking van opiaten zal doen verminderen. Ook onderzoeken we welk hersencircuit betrokken is bij deze effecten. Op deze manier proberen we voldoende bewijs te verzamelen voor een eerste studie van dit middel bij mensen. Dit zou een belangrijke stap zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie tegen verslaving en het verlichten van de enorme last die verslaving legt op onze volksgezondheid en maatschappij.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- In totaal zijn maximaal 448 ratten nodig.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Tijdens een operatie onder adequate anesthesie wordt bij de dieren een intraveneuze katheter aangelegd die nodig is om zichzelf de verslavende stoffen toe te dienen in een gedragsopstelling. Bij een deel van de dieren zal ook een canule geplaatst worden op de schedel die gebruikt wordt om het middel artemisinin direct in de hersenen toe te dienen. De operaties en het bijkomen uit de narcose kunnen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en aseptische operatietechnieken worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Het ongerief van de dieren wordt ingeschat op maximaal matig. Het matige ongerief komt voort uit de operatie, alle andere handelingen zoals de dagelijkse trainingen en de injectieprocedures gaan gepaard met licht ongerief.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Aan het einde van de proef worden de dieren gedood om de juiste injectieplaats te controleren en weefsel voor onderzoek te verzamelen.

## 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.
- Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo
- Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats (op basis van de verkregen resultaten) over het wel of



gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

niet uitvoeren van vervolgexperimenten. Zo zullen vervolgexperimenten alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. Daarnaast kunnen we in één experiment meerdere parameters meten, zoals gebruik, motivatie en terugval.

#### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De rat is het meest gebruikte diersoort in verslavingsmodellen en laat ook duidelijk verslavingsgedrag zien. Het gebruikte diersoort beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. Een positief resultaat in dit model wordt dan ook gezien als een belangrijke voorwaarde en aanleiding om verder onderzoek te doen bij mensen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Er vinden dagelijkse welzijnsrapportages plaats waarbij het dier op uiterlijke gezondheidskenmerken en welzijn wordt gescoord. Daarnaast worden adequate anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken en worden duidelijk omschreven humane eindpunten toegepast. Operaties en biotechnische handelingen worden uitgevoerd onder algehele narcose en met adequate pijnstilling door ervaren personeel aan de hand van gevalideerde protocollen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



# Advies aan CCD

## B

Datum 24 juli 2020

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209667

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids  
 Aanvraagnummer: AVD20209667  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek



### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	<p>De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk bij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht <sup>53</sup> een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn.</p> <p>De aanvrager is vervolgens door de CCD in de gelegenheid gesteld om de aanvraag opnieuw in te dienen.</p> <p>Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is.</p> <p>Er zijn door het Secretariaat geen aanvullende vragen gesteld.</p>			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>				
	Ratten (Rattus norvegicus)		448	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

# Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD\_5.1 lid2e - 5.1 lid2e .pdf

---

Pagina: 1

---

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 31-7-2020 10:09:42  
waarom zit het machtigingsformulier in de map? Die hoeft niet naar het bestuur. is voor onze administratie.

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 31-7-2020 16:17:16

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 31-7-2020 10:06:50  
ik zou hierbij even verduidelijken dat dit volgens de DEC onduidelijk is. Nu is dat niet helemaal duidelijk.

Status

5.1 lid2e Geaccepteerd 31-7-2020 16:19:11

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Citaat:

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

nvt.


<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek naar een mogelijk medicijn tegen nicotine en opiaten verslaving. Een groot deel van deze verslavingen kan door het grote publiek worden beschouwd als een gevolg van vermijdbaar schadelijk/risicovol gedrag.

## 2 DEC advies



<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat C1 (toetsbaarheid):</p> <p>De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk hierbij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapoleerbaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.</p> <p>Na navraag van de onderzoekers bij een klinisch farmacoloog blijkt dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU.</p> <p>Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze</p>
-------------------	---

## Pagina: 2

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 31-7-2020 10:16:19  
5.2 lid1

Status

 5.1 lid2e Geaccepteerd    31-7-2020 16:31:06  
 Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 31-7-2020 16:31:13  
notitie benoemd

---

aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Citaat C8. (opzet):

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Het project bevat 1 appendix. Er is een duidelijk keuzemoment ingebouwd, pas wanneer er een duidelijke effectiviteit van artemisinin wordt gevonden in de eerste experimenten (nicotine) of tweede serie experimenten (opioïde) zal men verder gaan met de vervolggexperimenten. Dit is voor de DEC een belangrijk gegeven gezien de, in de ogen van de DEC, zwakke wetenschappelijke onderbouwing van de geclaimde interferentie van artemisinin van het GABAerge systeem in neuronen. Alleen indien er duidelijke aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam is, is naar opvatting van de DEC vervolgonderzoek zinvol; de ingebouwde beslispunten geven deze garantie.

Citaat C10. (huisvesting):

Na de operatie worden de dieren alleen gehuisvest (voor ongeveer 10 weken). Dit is nodig vanwege mogelijke interferentie met de hechtingen, katheter en intracraniale canule na de operatie, door de ratten in dezelfde kooi.

Citaat C14. (vervanging):

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Binnen de DEC was discussie of dierproeven nodig zijn wanneer een geregistreerd medicijn off label wordt ingezet voor een andere indicatie. Daarover is extern advies ingewonnen. Bij navraag blijkt dat er in de EU geen geschikt geregistreerd middel is dat alleen de werkzame stof artemisinin bevat. De middelen die op de markt zijn, betreffen combinatiepreparaten en zijn niet orale vorm verkrijgbaar, zie de vragen van de DEC aan de aanvragers. Het was dus in alle waarschijnlijkheid niet mogelijk om met behulp van een reeds voor een andere indicatie geregistreerd medicijn klinische trials bij mensen te doen om de effectiviteit van artemisinin bij verslaving te testen. Tijdens de afweging is dit voor de DEC een groot dilemma geweest of er in het voorliggende

geval inderdaad onvoldoende onderbouwing was voor het uitvoeren van een clinical trial en dat hiervoor eerst dierproeven noodzakelijk zijn. In het voorliggende geval is de DEC na het inwinnen van informatie uiteindelijk tot de opvatting gekomen dat dierproeven in alle waarschijnlijkheid een eerste noodzakelijke stap zullen zijn voorafgaand aan een clinical trial (zie ook dilemma). Bovendien bleek na beantwoording van de vragen dat er op dit moment ook nog geen overtuigend wetenschappelijk bewijs is dat artemisinin werkzaam zou zijn bij verslaafde patiënten. De DEC onderschrijft de route dat het onderzoek wordt dus ingezet om eerste een proof-of-concept bij dieren te verkrijgen, waarna mogelijke klinische trial bij mensen een volgende stap zou kunnen zijn. Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.

De keuze voor het gebruik van rat modellen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Het gebruikte diermodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. De rat is de meest gebruikte diersoort voor dergelijke verslavingsexperimenten, zodat een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over of de stof artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden het gebruik van 448 ratten in deze dierproef die daarvan matig ongerief ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot aanzienlijk nadeel voor deze proefdieren. De waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden zijn: beperkt voordeel vanwege de kennisontwikkeling en het mogelijk ontwikkelen van een proof-of-concept. Deze kennis kan ook gebruikt worden in andere wetenschapsgebieden zoals verslavingsonderzoek. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen

van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van nicotine en opioïden verslaving. De huidige mogelijkheden hiervoor zijn beperkt.

De DEC is van mening dat de lange termijn belangen van de patiënten (en de samenleving) in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 448 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden en tijdens de proef matig ongerief ondervinden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over hoe artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over en geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving, is afgewogen tegen het, als matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 448 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over of artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Inzichten in het mogelijke werkingsmechanisme zullen niet worden verkregen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende behandelstrategieën zullen worden ontwikkeld. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat naar het oordeel van de DEC het, als substantieel te kwalificeren, maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het gebruik van maximaal 448 ratten en het daarbij verwachte matige ongerief.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij



- anderen

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.

Eén lid gaat niet mee. Dit lid is van mening dat het beginnen met verslavende middelen een keuze is die de mens zelf doelbewust maakt. Tevens is zij van mening dat terugvallen in verslaving ook met alternatieven aan te pakken is en dat nieuw onderzoek met proefdieren niet nodig is. Het ongerief bij de dieren weegt voor dit lid niet op tegen de belangen van het onderzoek. Een tweede lid schaart zich achter het meerderheidsstandpunt maar is van opvatting dat de gepresenteerde wetenschappelijke onderbouwing waarom artemisinin een rol zou kunnen spelen in verslaving niet erg overtuigend is; echter de ingebouwde beslismomenten geven voor dit lid voldoende garantie dat er geen verdere proeven worden gedaan indien blijkt dat er geen resultaten zijn die op effectiviteit wijzen.

De andere leden zijn van mening dat de belangen van het onderzoek opwegen tegen het maximaal matig ongerief dat teweeg wordt gebracht bij de dieren, maar onderkennen wel de hierna volgende dilemma's.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

De DEC heeft bij de beoordeling van dit project wel een dilemma geconstateerd. Enerzijds het doen van onderzoek naar mogelijke behandelmethoden van verslaving, waarvoor dierproeven worden gedaan, en anderzijds de 'vrije wil' om te beginnen met het gebruik van verslavende middelen. Verslaving aan nicotine en opioïden is een maatschappelijk vraagstuk, waarbij men, in het algemeen, begint te gebruiken uit 'vrije wil'. Echter het is duidelijk dat er niet bij iedereen sprake is van een 'vrije keuze'. Denk hierbij aan adolescenten, mensen die een verhoogde neiging tot impulsiviteit en compulsiviteit hebben of lijden aan een psychiatrische stoornis zoals schizofrenie. Ook spelen sociaal-economische factoren een rol bij het ontwikkelen van en het afkomen van een verslaving. Bij kwetsbare groepen en gevoelige mensen kan een behandeling noodzakelijk zijn om definitief van een verslaving af te komen, daaraan kan dit onderzoek op termijn een bijdrage leveren. Het is duidelijk dat ook preventieve maatregelen een rol moeten krijgen: Het is de taak van ouders en de overheid om ervoor te zorgen dat deze

kwetsbare en gevoelige mensen niet in aanraking komen met dergelijke verslavende middelen. Door maatregelen te nemen zou het doen van onderzoek met dierproeven, om een behandeling tegen verslaving te vinden, wellicht minder noodzakelijk zijn. Omdat nicotine overal vrijelijk te verkrijgen zijn voor mensen ouder dan 18 jaar, én er op dit moment onvoldoende inzicht is in alle kwetsbare groepen, is er geen basis om dit vanuit de overheid gestalte te geven met afdoende preventieve maatregelen. Dit geldt echter niet voor opioïden.

Een ander vraagstuk is het doen van dierproeven met werkzame stoffen die reeds als geregistreerd medicijn (voor andere indicaties) op de markt zijn. Er lijken geen duidelijke richtlijnen te bestaan voor de vraag of het bij het off label toepassen van medicijnen het wettelijk, medisch of ethisch noodzakelijk is om eerst dierproeven te doen. Wanneer de veiligheid van een middel reeds is bewezen bij de registratie van het geneesmiddel, dan zou het middel in principe (met informed consent) ook direct ingezet kunnen worden in clinical trials voor mensen en kunnen (nieuwe) dierenproeven wellicht achterwege blijven. Om een overwogen besluit te kunnen nemen zou een samenspraak met een METC noodzakelijk zijn, om het alternatief, een voorstel voor een clinical trial, te onderzoeken en om op basis daarvan de conclusie te kunnen trekken, namelijk dat er voor de dierproeven al of niet een alternatief beschikbaar is.

### 3 Kwaliteit DEC advies

#### Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat:</p> <p>The main objective of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.</p> <p>Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.</p> <p>Specifically, we aim to address the following questions:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.</li><li>2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?</li><li>3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?</li></ol>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <p>In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.</p> <p>In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world (<a href="http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf">http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf</a>). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017. Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols. Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DECadvies C7: 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. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met collega's in de academische wereld en andere instituten.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.</p>
<p>Verminderen</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.</p>

Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures. The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.</p> <p>The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>	HEP: <2%	<p>Citaat: We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Loss of body weight: <math>\geq 15\%</math> in 24 hour period.</li> <li>- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage</li> <li>- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days</li> <li>- Tremors/convulsions from damaged intracranial canula</li> <li>- Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin</li> <li>- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time</li> </ul>
Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid1

De dieren worden individueel gehuisvest. 5.2 lid1

5.2 lid1

Ten eerste betreft het onderzoek waarbij proefdieren worden ingezet voor onderzoek naar mogelijke behandeling tegen verslaving aan nicotine en opiaten bij mensen. Deze verslavingen kunnen het gevolg zijn van vermijdbaar schadelijk gedrag/schadelijke keuzes en het ontstaan van een verslaving is initieel in een aanzienlijk deel van de gevallen mogelijk vermijdbaar. Toch komt de keuze tot middelengebruik niet altijd (geheel) vrijwillig tot stand en zijn er vele interne en externe factoren van invloed op het risico om een verslaving te ontwikkelen. De aanvrager geeft aan dat verslaving tegenwoordig als een biologische stoornis wordt gezien en met name het 'terugvallen' in een verslaving vaak geen vrijwillige keuze is. Ook wordt in het projectvoorstel terecht benoemd dat opiaten ook medicinaal worden voorgeschreven en dit steeds vaker in verslavingen resulteert. 5.2 lid1

# 5.2 lid1

Het tweede dilemma betreft de vraag of dierproeven noodzakelijk zijn om te onderzoeken of een geregistreerd medicijn met de werkzame stof artemisinin mogelijk kan worden ingezet voor een andere indicatie, of dat ook direct in mensen zou kunnen worden onderzocht. De DEC heeft hier vragen over gesteld en extern advies over ingewonnen bij het <sup>5.1 lid2n</sup> METC. De antwoorden van zowel de aanvrager als de METC <sup>5.2 lid1</sup>

# 5.2 lid1

# 5.1 lid2e, 5.2 lid1

## 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

## Pagina: 12

---

Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 31-7-2020 10:27:32  
van

Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd    31-7-2020 16:31:43

---

Nummer: 2    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 31-7-2020 10:23:04

ook hier heel graag verwijzen naar de eerdere discussie binnen de CCD over onderzoek naar verslavende middelen. Er is bewust gekozen geen extern advies op te vragen en geen uitvoeringsbeleid hiervoor te maken. Zie notitie CCD20-07-07. 5.2 lid1

Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd    31-7-2020 16:37:53

---

Nummer: 3    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 31-7-2020 10:27:30

in dit geval zou ik het laten, alle dieren ondergaan maximaal matig ongerief. Dus wat mij betreft niet verwarrend hier.

Status  
5.1 lid2e Geaccepteerd    31-7-2020 16:37:59



## 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

### **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



# Advies aan CCD

Datum 31 juli 2020  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209667

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids  
 Aanvraagnummer: AVD20209667  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	<p>De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Volgens de DEC is was onduidelijk of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel mogelijk zou zijn.</p> <p>De aanvrager is vervolgens door de CCD in de gelegenheid gesteld om de aanvraag opnieuw in te dienen.</p> <p>Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is.</p> <p>Er zijn door het Secretariaat geen aanvullende vragen gesteld.</p>			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )		448	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Citaat:

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

nvt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek naar een mogelijk medicijn tegen nicotine en opiaten verslaving. Een groot deel van deze verslavingen kan door het grote publiek worden beschouwd als een gevolg van vermijdbaar schadelijk/risicovol gedrag.  In de vergadering van 15 mei is een notitie (zie AVD20209667i_CCD20-07-07) besproken over dit dilemma op basis van correspondentie met het Centrum voor Ethiek en Gezondheid (CEG) is destijds besloten om verslaving (aan drugs) bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen niet te beschouwen als eigen verantwoordelijkheid, maar als een ziekte waar mensen aan lijden die (mede) veroorzaakt wordt door zowel genetische als omgevingsfactoren en om aanvragen gericht op verslaving bij de ethische afweging niet anders te behandelen dan aanvragen gericht op lichamelijk en mentale ziektes.

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat C1 (toetsbaarheid): De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk hierbij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapolatiebaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit
-------------------	---

geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.

Na navraag van de onderzoekers bij een klinisch farmacoloog blijkt dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU.

Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Citaat C8. (opzet):

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Het project bevat 1 appendix. Er is een duidelijk keuzemoment ingebouwd, pas wanneer er een duidelijke effectiviteit van artemisinin wordt gevonden in de eerste experimenten (nicotine) of tweede serie experimenten (opioïde) zal men verder gaan met de vervolgexperimenten. Dit is voor de DEC een belangrijk gegeven gezien de, in de ogen van de DEC, zwakke wetenschappelijke onderbouwing van de geclaimde interferentie van artemisinin van het GABAerge systeem in neuronen. Alleen indien er duidelijke aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam is, is naar opvatting van de DEC vervolgonderzoek zinvol; de ingebouwde beslispunten geven deze garantie.

Citaat C10. (huisvesting):

Na de operatie worden de dieren alleen gehuisvest (voor ongeveer 10 weken). Dit is nodig vanwege mogelijke interferentie met de hechtingen, katheter en intracraniale canule na de operatie, door de ratten in dezelfde kooi.

Citaat C14. (vervanging):

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Binnen de DEC was discussie of dierproeven nodig zijn wanneer een geregistreerd medicijn off label wordt ingezet voor een andere indicatie. Daarover is extern advies ingewonnen. Bij navraag blijkt dat er in de EU geen geschikt geregistreerd middel is dat alleen de werkzame stof artemisinin bevat. De middelen die op de markt zijn, betreffen combinatiepreparaten en zijn niet orale vorm verkrijgbaar, zie de vragen van de DEC aan de aanvragers. Het was dus in alle waarschijnlijkheid niet mogelijk om met behulp van een reeds voor een andere indicatie geregistreerd medicijn klinische trials bij mensen te doen om de effectiviteit van artemisinin bij verslaving te testen. Tijdens de afweging is dit voor de DEC een groot dilemma geweest of er in het voorliggende geval inderdaad onvoldoende onderbouwing was voor het uitvoeren van een clinical trial en dat hiervoor eerst dierproeven noodzakelijk zijn. In het voorliggende geval is de DEC na het inwinnen van informatie uiteindelijk tot de opvatting gekomen dat dierproeven in alle waarschijnlijkheid een eerste noodzakelijke stap zullen zijn voorafgaand aan een clinical trial (zie ook dilemma). Bovendien bleek na beantwoording van de vragen dat er op dit moment ook nog geen overtuigend wetenschappelijk bewijs is dat artemisinin werkzaam zou zijn bij verslaafde patiënten. De DEC onderschrijft de route dat het onderzoek wordt dus ingezet om eerste een proof-of-concept bij dieren te verkrijgen, waarna mogelijke klinische trial bij mensen een volgende stap zou kunnen zijn. Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.

De keuze voor het gebruik van rat modellen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Het gebruikte diermodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. De rat is de meest gebruikte diersoort voor dergelijke verslavingsexperimenten, zodat een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over of de stof artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden het gebruik van 448 ratten in deze dierproef die daarvan matig ongerief

ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot aanzienlijk nadeel voor deze proefdieren. De waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden zijn: beperkt voordeel vanwege de kennisontwikkeling en het mogelijk ontwikkelen van een proof-of-concept. Deze kennis kan ook gebruikt worden in andere wetenschapsgebieden zoals verslavingsonderzoek. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van nicotine en opioïden verslaving. De huidige mogelijkheden hiervoor zijn beperkt.

De DEC is van mening dat de lange termijn belangen van de patiënten (en de samenleving) in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 448 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden en tijdens de proef matig ongerief ondervinden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over hoe artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over en geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving, is afgewogen tegen het, als matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 448 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over of artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Inzichten in het mogelijke werkingsmechanisme zullen niet worden verkregen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende behandelstrategieën zullen worden ontwikkeld. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis

op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat naar het oordeel van de DEC het, als substantieel te kwalificeren, maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het gebruik van maximaal 448 ratten en het daarbij verwachte matige ongerief.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij  
- anderen

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.

Eén lid gaat niet mee. Dit lid is van mening dat het beginnen met verslavende middelen een keuze is die de mens zelf doelbewust maakt. Tevens is zij van mening dat terugvallen in verslaving ook met alternatieven aan te pakken is en dat nieuw onderzoek met proefdieren niet nodig is. Het ongerief bij de dieren weegt voor dit lid niet op tegen de belangen van het onderzoek. Een tweede lid schaart zich achter het meerderheidsstandpunt maar is van opvatting dat de gepresenteerde wetenschappelijke onderbouwing waarom artemisinin een rol zou kunnen spelen in verslaving niet erg overtuigend is; echter de ingebouwde beslismomenten geven voor dit lid voldoende garantie dat er geen verdere proeven worden gedaan indien blijkt dat er geen resultaten zijn die op effectiviteit wijzen.

De andere leden zijn van mening dat de belangen van het onderzoek opwegen tegen het maximaal matig ongerief dat teweeg wordt gebracht bij de dieren, maar onderkennen wel de hierna volgende dilemma's.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

De DEC heeft bij de beoordeling van dit project wel een dilemma geconstateerd. Enerzijds het doen van onderzoek naar mogelijke behandelmethoden van verslaving, waarvoor dierproeven worden gedaan, en anderzijds de 'vrije wil' om te beginnen met het gebruik van verslavende middelen. Verslaving aan nicotine en opioïden is een

maatschappelijk vraagstuk, waarbij men, in het algemeen, begint te gebruiken uit 'vrije wil'. Echter het is duidelijk dat er niet bij iedereen sprake is van een 'vrije keuze'. Denk hierbij aan adolescenten, mensen die een verhoogde neiging tot impulsiviteit en compulsiviteit hebben of lijden aan een psychiatrische stoornis zoals schizofrenie. Ook spelen sociaal-economische factoren een rol bij het ontwikkelen van en het afkomen van een verslaving. Bij kwetsbare groepen en gevoelige mensen kan een behandeling noodzakelijk zijn om definitief van een verslaving af te komen, daaraan kan dit onderzoek op termijn een bijdrage leveren. Het is duidelijk dat ook preventieve maatregelen een rol moeten krijgen: Het is de taak van ouders en de overheid om ervoor te zorgen dat deze kwetsbare en gevoelige mensen niet in aanraking komen met dergelijke verslavende middelen. Door maatregelen te nemen zou het doen van onderzoek met dierproeven, om een behandeling tegen verslaving te vinden, wellicht minder noodzakelijk zijn. Omdat nicotine overal vrijelijk te verkrijgen zijn voor mensen ouder dan 18 jaar, én er op dit moment onvoldoende inzicht is in alle kwetsbare groepen, is er geen basis om dit vanuit de overheid gestalte te geven met afdoende preventieve maatregelen. Dit geldt echter niet voor opioïden.

Een ander vraagstuk is het doen van dierproeven met werkzame stoffen die reeds als geregistreerd medicijn (voor andere indicaties) op de markt zijn. Er lijken geen duidelijke richtlijnen te bestaan voor de vraag of het bij het off label toepassen van medicijnen het wettelijk, medisch of ethisch noodzakelijk is om eerst dierproeven te doen. Wanneer de veiligheid van een middel reeds is bewezen bij de registratie van het geneesmiddel, dan zou het middel in principe (met informed consent) ook direct ingezet kunnen worden in clinical trials voor mensen en kunnen (nieuwe) dierenproeven wellicht achterwege blijven. Om een overwogen besluit te kunnen nemen zou een samenspraak met een METC noodzakelijk zijn, om het alternatief, een voorstel voor een clinical trial, te onderzoeken en om op basis daarvan de conclusie te kunnen trekken, namelijk dat er voor de dierproeven al of niet een alternatief beschikbaar is.

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
----------------------

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
---



#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The main objective of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.</p> <p>Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.</p> <p>Specifically, we aim to address the following questions:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.</li><li>2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?</li><li>3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?</li></ol>
-------------------------------------	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <p>In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.</p> <p>In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world (<a href="http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf">http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf</a>). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017. Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols. Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DECadvies C7: 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. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met collega's in de academische wereld en andere instituten.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.</p>
<p>Verminderen</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.</p>

Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures. The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.</p> <p>The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>	HEP: <2%	<p>Citaat: We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Loss of body weight: <math>\geq 15\%</math> in 24 hour period.</li> <li>- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage</li> <li>- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days</li> <li>- Tremors/convulsions from damaged intracranial canula</li> <li>- Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin</li> <li>- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time</li> </ul>
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

De dieren worden individueel gehuisvest. 5.2 lid1

### 5.2 lid1

Ten eerste betreft het onderzoek waarbij proefdieren worden ingezet voor onderzoek naar mogelijke behandeling tegen verslaving aan nicotine en opiaten bij mensen. Deze verslavingen kunnen het gevolg zijn van vermijdbaar schadelijk gedrag/schadelijke keuzes en het ontstaan van een verslaving is initieel in een aanzienlijk deel van de gevallen mogelijk vermijdbaar. Toch komt de keuze tot middelengebruik niet altijd (geheel) vrijwillig tot stand en zijn er vele interne en externe factoren van invloed op het risico om een verslaving te ontwikkelen. De aanvrager geeft aan dat verslaving tegenwoordig als een biologische stoornis wordt gezien en met name het 'terugvallen' in een verslaving vaak geen vrijwillige keuze is. Ook wordt in het projectvoorstel terecht benoemd dat opiaten ook medicinaal worden voorgeschreven en dit steeds vaker in verslavingen resulteert.

Op basis van vergelijkbare argumenten is in de CCD vergadering van 15 mei besloten (zie notitie AVD20209667i\_CCD20-07-07) om verslaving (aan drugs) bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen niet te beschouwen als eigen verantwoordelijkheid, maar als een ziekte waar mensen aan lijden die (mede) veroorzaakt wordt door zowel genetische als omgevingsfactoren en om aanvragen gericht op verslaving bij de ethische afweging niet anders te behandelen dan aanvragen gericht op lichamelijk en mentale ziektes.

### 5.2 lid1

Het tweede dilemma betreft de vraag of dierproeven noodzakelijk zijn om te onderzoeken of een geregistreerd medicijn met de werkzame stof artemisinin mogelijk kan worden ingezet voor een andere indicatie, of dat ook direct in mensen zou kunnen worden onderzocht. De DEC heeft hier vragen over gesteld en extern advies over ingewonnen bij het <sup>5.1 lid2b</sup>METC. De antwoorden van zowel de aanvrager als de METC 5.2 lid1

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill, obscuring the text underneath.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 10 augustus 2020 12:22  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e; 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 20209667

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 09-04-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209667. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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

- In de NTS worden onder punt 3.4 nog niet alle ongerief veroorzakende handelingen benoemd die de dieren in het project zullen ondergaan. Zo benoemt u bijvoorbeeld niet dat de dieren individueel zullen worden gehuisvest. Wij verzoeken u om sectie 3.4 aan te vullen, zodat de NTS een betere representatie van het project zal zijn.

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### 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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



## 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project    | Is het anti-malaria middel artemisinin een mogelijk medicijn tegen verslaving? |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Verslaving, roken, opiaten, hersenen, terugval                                 |

### 2 Categorie van het project

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> 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) | Verslaving aan tabak en aan opiaten is een groot probleem in onze maatschappij; jaarlijks sterven er in Nederland 20.000 mensen aan de gevolgen van roken. Heroïnegebruik komt gelukkig nog maar weinig voor in de algemene bevolking. Het aantal gebruikers van de medische opioïde oxycodon laat echter bijna een verdubbeling zien tussen 2014 en 2018. Dit is een zorgelijk ontwikkeling. Zo kostte opiaatgebruik in de Verenigde Staten in 2017 aan 70.000 mensen het leven. Verslaving wordt gezien als een hersenaandoening. Een belangrijk kenmerk van verslaving is de voortdurende drang om het middel te gebruiken ondanks de enorme schade die het berokkent aan het individu (compulsief gebruik). Een andere belangrijke factor is de terugval in gebruik na abstinentie, veroorzaakt door blootstelling aan middel-geassocieerde omgevingsprikkels. De huidige behandelingen tegen verslaving zijn weinig effectief. In dit onderzoek testen |
|---|---|



we de effecten van een middel dat (buiten de EU) al geregistreerd is voor andere medische toepassingen op deze twee belangrijke belemmeringen voor succesvolle behandeling: terugval en gebruik.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Op basis van eerder onderzoek verwachten we dat dit middel de kans op terugval in nicotineverslaving en de verslavende werking van opiaten zal doen verminderen. Ook onderzoeken we welk hersencircuit betrokken is bij deze effecten. Op deze manier proberen we voldoende bewijs te verzamelen voor een eerste studie van dit middel bij mensen. Dit zou een belangrijke stap zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie tegen verslaving en het verlichten van de enorme last die verslaving legt op onze volksgezondheid en maatschappij.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- In totaal zijn maximaal 448 ratten nodig.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Tijdens een operatie onder adequate anesthesie wordt bij de dieren een intraveneuze katheter aangelegd die nodig is om zichzelf de verslavende stoffen toe te dienen in een gedragsopstelling. Bij een deel van de dieren zal ook een canule geplaatst worden op de schedel die gebruikt wordt om het middel artemisinine direct in de hersenen toe te dienen. De operaties en het bijkomen uit de narcose kunnen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en aseptische operatietechnieken worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken. Na de operatie zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Dit is om te voorkomen dat kooigenoten schade toebrengen aan katheter en canule. De verwachte bijwerkingen van artemisinine zullen bij de gebruikte doseringen licht zijn.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Het ongerief van de dieren wordt ingeschat op maximaal matig. Het matige ongerief komt voort uit de operatie, alle andere handelingen zoals de dagelijkse trainingen en de injectieprocedures gaan gepaard met licht ongerief.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Aan het einde van de proef worden de dieren gedood om de juiste injectieplaats te controleren en weefsel voor onderzoek te verzamelen.

## 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.
- Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Een statistische toets wordt gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken. Na de eerste serie van experimenten vindt er een afweging plaats (op basis van de verkregen resultaten) over het wel of niet uitvoeren van vervolggexperimenten. Zo zullen vervolggexperimenten alleen plaatsvinden als er een positief resultaat wordt gevonden in de eerste serie experimenten. Daarnaast kunnen we in één experiment meerdere parameters meten, zoals gebruik, motivatie en terugval.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersmodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De rat is het meest gebruikte diersoort in verslavingsmodellen en laat ook duidelijk verslavingsgedrag zien. Het gebruikte diersmodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. Een positief resultaat in dit model wordt dan ook gezien als een belangrijke voorwaarde en aanleiding om verder onderzoek te doen bij mensen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Er vinden dagelijkse welzijnsrapportages plaats waarbij het dier op uiterlijke gezondheidskenmerken en welzijn wordt gescoord. Daarnaast worden adequate anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken en worden duidelijk omschreven humane eindpunten toegepast. Operaties en biotechnische handelingen worden uitgevoerd onder algehele narcose en met adequate pijnstilling door ervaren personeel aan de hand van gevalideerde protocollen.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

---

Beoordeling achteraf

---

Andere opmerkingen

---



# Advies aan CCD

Datum 24 augustus 2020  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209667

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids  
 Aanvraagnummer: AVD20209667  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	<p>De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Volgens de DEC is was onduidelijk of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel mogelijk zou zijn.</p> <p>De aanvrager is vervolgens door de CCD in de gelegenheid gesteld om de aanvraag opnieuw in te dienen.</p> <p>Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is.</p> <p>Er zijn door het Secretariaat geen aanvullende vragen gesteld.</p>			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )		448	<b>Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn</b>

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Citaat:

After surgery the animals will be single-housed. We do this because of potential interference with the sutures, jugular catheter and intracranial cannula after the surgery by the rats in the same cage.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

nvt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek naar een mogelijk medicijn tegen nicotine en opiaten verslaving. Een groot deel van deze verslavingen kan door het grote publiek worden beschouwd als een gevolg van vermijdbaar schadelijk/risicovol gedrag.  In de vergadering van 15 mei is een notitie (zie AVD20209667i_CCD20-07-07) besproken over dit dilemma op basis van correspondentie met het Centrum voor Ethiek en Gezondheid (CEG) is destijds besloten om verslaving (aan drugs) bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen niet te beschouwen als eigen verantwoordelijkheid, maar als een ziekte waar mensen aan lijden die (mede) veroorzaakt wordt door zowel genetische als omgevingsfactoren en om aanvragen gericht op verslaving bij de ethische afweging niet anders te behandelen dan aanvragen gericht op lichamelijk en mentale ziektes.

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat C1 (toetsbaarheid): De DEC heeft de CCD laten weten dat in de voorliggende aanvraag informatie ontbrak waardoor de DEC niet tot een advies aan de CCD kon komen. Onduidelijk hierbij is ten eerste of een METC dierproeven noodzakelijk acht bij een reeds geregistreerd geneesmiddel en ten tweede of dat onderzoek naar de werking met betrekking tot verslaving bij mensen in beginsel al mogelijk zou zijn. In dat laatste geval moet sprake zijn van geschikte vervanging. Van belang is dat een METC de extrapoleerbaarheid van de resultaten naar de humane situatie in dit
-------------------	--

geval als feitelijk voldoende inschat. Zo niet, dan vervalt de translationele waarde van de dierproeven en daarmee tevens weer de noodzaak in verband met de klinische toepassing. De DEC heeft naar aanleiding van de zorgen hierover navraag gedaan bij een extern adviseur (een METC), maar kan op basis van deze feedback nog niet tot een oordeel komen.

Na navraag van de onderzoekers bij een klinisch farmacoloog blijkt dat geen enkel artemisinine-derivaat als enkelvoudig preparaat daadwerkelijk geregistreerd is in NL/EU.

Na het verbeteren van de aanvraag en het beantwoorden van de specifieke vragen die de DEC naar aanleiding hiervan nog bij deze aanvraag heeft gesteld is de DEC tot de conclusie gekomen dat deze aanvraag wel toetsbaar is. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Citaat C8. (opzet):

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Het project bevat 1 appendix. Er is een duidelijk keuzemoment ingebouwd, pas wanneer er een duidelijke effectiviteit van artemisinin wordt gevonden in de eerste experimenten (nicotine) of tweede serie experimenten (opioïde) zal men verder gaan met de vervolgexperimenten. Dit is voor de DEC een belangrijk gegeven gezien de, in de ogen van de DEC, zwakke wetenschappelijke onderbouwing van de geclaimde interferentie van artemisinin van het GABAerge systeem in neuronen. Alleen indien er duidelijke aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam is, is naar opvatting van de DEC vervolgonderzoek zinvol; de ingebouwde beslispunten geven deze garantie.

Citaat C10. (huisvesting):

Na de operatie worden de dieren alleen gehuisvest (voor ongeveer 10 weken). Dit is nodig vanwege mogelijke interferentie met de hechtingen, katheter en intracraniale canule na de operatie, door de ratten in dezelfde kooi.

Citaat C14. (vervanging):

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Binnen de DEC was discussie of dierproeven nodig zijn wanneer een geregistreerd medicijn off label wordt ingezet voor een andere indicatie. Daarover is extern advies ingewonnen. Bij navraag blijkt dat er in de EU geen geschikt geregistreerd middel is dat alleen de werkzame stof artemisinin bevat. De middelen die op de markt zijn, betreffen combinatiepreparaten en zijn niet orale vorm verkrijgbaar, zie de vragen van de DEC aan de aanvragers. Het was dus in alle waarschijnlijkheid niet mogelijk om met behulp van een reeds voor een andere indicatie geregistreerd medicijn klinische trials bij mensen te doen om de effectiviteit van artemisinin bij verslaving te testen. Tijdens de afweging is dit voor de DEC een groot dilemma geweest of er in het voorliggende geval inderdaad onvoldoende onderbouwing was voor het uitvoeren van een clinical trial en dat hiervoor eerst dierproeven noodzakelijk zijn. In het voorliggende geval is de DEC na het inwinnen van informatie uiteindelijk tot de opvatting gekomen dat dierproeven in alle waarschijnlijkheid een eerste noodzakelijke stap zullen zijn voorafgaand aan een clinical trial (zie ook dilemma). Bovendien bleek na beantwoording van de vragen dat er op dit moment ook nog geen overtuigend wetenschappelijk bewijs is dat artemisinin werkzaam zou zijn bij verslaafde patiënten. De DEC onderschrijft de route dat het onderzoek wordt dus ingezet om eerste een proof-of-concept bij dieren te verkrijgen, waarna mogelijke klinische trial bij mensen een volgende stap zou kunnen zijn. Hersenaandoeningen zoals verslaving zijn zeer complex en de veranderingen die verslavende stoffen teweegbrengen in de hersenen kunnen niet op detailniveau bij de mens worden bestudeerd. Ook het zeer selectief manipuleren van hersengebieden teneinde het gedrag te beïnvloeden is nog niet mogelijk bij mensen. Ook kunnen we deze processen niet nabootsen in celculturen, omdat de complexiteit van de neurale netwerken en de communicatie tussen hersengebieden ontbreekt. De rat is het meest gebruikte diersoort voor dergelijke experimenten, hetgeen een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk maakt.

De keuze voor het gebruik van rat modellen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Het gebruikte diermodel beschikt over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het menselijke verslavingsgedrag. De rat is de meest gebruikte diersoort voor dergelijke verslavingsexperimenten, zodat een goede vergelijking met ander onderzoek mogelijk is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over of de stof artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden het gebruik van 448 ratten in deze dierproef die daarvan matig ongerief

ondervinden?

2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot aanzienlijk nadeel voor deze proefdieren. De waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden zijn: beperkt voordeel vanwege de kennisontwikkeling en het mogelijk ontwikkelen van een proof-of-concept. Deze kennis kan ook gebruikt worden in andere wetenschapsgebieden zoals verslavingsonderzoek. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van nicotine en opioïden verslaving. De huidige mogelijkheden hiervoor zijn beperkt.

De DEC is van mening dat de lange termijn belangen van de patiënten (en de samenleving) in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 448 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden en tijdens de proef matig ongerief ondervinden.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over hoe artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over en geneesmiddelen voor de behandeling van verslaving, is afgewogen tegen het, als matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 448 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over of artemisinin een mogelijk medicijn is tegen verslaving aan nicotine en opioïden. Inzichten in het mogelijke werkingsmechanisme zullen niet worden verkregen.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende behandelstrategieën zullen worden ontwikkeld. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis

op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat naar het oordeel van de DEC het, als substantieel te kwalificeren, maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het gebruik van maximaal 448 ratten en het daarbij verwachte matige ongerief.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij  
- anderen

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt.

Eén lid gaat niet mee. Dit lid is van mening dat het beginnen met verslavende middelen een keuze is die de mens zelf doelbewust maakt. Tevens is zij van mening dat terugvallen in verslaving ook met alternatieven aan te pakken is en dat nieuw onderzoek met proefdieren niet nodig is. Het ongerief bij de dieren weegt voor dit lid niet op tegen de belangen van het onderzoek. Een tweede lid schaart zich achter het meerderheidsstandpunt maar is van opvatting dat de gepresenteerde wetenschappelijke onderbouwing waarom artemisinin een rol zou kunnen spelen in verslaving niet erg overtuigend is; echter de ingebouwde beslismomenten geven voor dit lid voldoende garantie dat er geen verdere proeven worden gedaan indien blijkt dat er geen resultaten zijn die op effectiviteit wijzen.

De andere leden zijn van mening dat de belangen van het onderzoek opwegen tegen het maximaal matig ongerief dat teweeg wordt gebracht bij de dieren, maar onderkennen wel de hierna volgende dilemma's.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

De DEC heeft bij de beoordeling van dit project wel een dilemma geconstateerd. Enerzijds het doen van onderzoek naar mogelijke behandelmethoden van verslaving, waarvoor dierproeven worden gedaan, en anderzijds de 'vrije wil' om te beginnen met het gebruik van verslavende middelen. Verslaving aan nicotine en opioïden is een



maatschappelijk vraagstuk, waarbij men, in het algemeen, begint te gebruiken uit 'vrije wil'. Echter het is duidelijk dat er niet bij iedereen sprake is van een 'vrije keuze'. Denk hierbij aan adolescenten, mensen die een verhoogde neiging tot impulsiviteit en compulsiviteit hebben of lijden aan een psychiatrische stoornis zoals schizofrenie. Ook spelen sociaal-economische factoren een rol bij het ontwikkelen van en het afkomen van een verslaving. Bij kwetsbare groepen en gevoelige mensen kan een behandeling noodzakelijk zijn om definitief van een verslaving af te komen, daaraan kan dit onderzoek op termijn een bijdrage leveren. Het is duidelijk dat ook preventieve maatregelen een rol moeten krijgen: Het is de taak van ouders en de overheid om ervoor te zorgen dat deze kwetsbare en gevoelige mensen niet in aanraking komen met dergelijke verslavende middelen. Door maatregelen te nemen zou het doen van onderzoek met dierproeven, om een behandeling tegen verslaving te vinden, wellicht minder noodzakelijk zijn. Omdat nicotine overal vrijelijk te verkrijgen zijn voor mensen ouder dan 18 jaar, én er op dit moment onvoldoende inzicht is in alle kwetsbare groepen, is er geen basis om dit vanuit de overheid gestalte te geven met afdoende preventieve maatregelen. Dit geldt echter niet voor opioïden.

Een ander vraagstuk is het doen van dierproeven met werkzame stoffen die reeds als geregistreerd medicijn (voor andere indicaties) op de markt zijn. Er lijken geen duidelijke richtlijnen te bestaan voor de vraag of het bij het off label toepassen van medicijnen het wettelijk, medisch of ethisch noodzakelijk is om eerst dierproeven te doen. Wanneer de veiligheid van een middel reeds is bewezen bij de registratie van het geneesmiddel, dan zou het middel in principe (met informed consent) ook direct ingezet kunnen worden in clinical trials voor mensen en kunnen (nieuwe) dierenproeven wellicht achterwege blijven. Om een overwogen besluit te kunnen nemen zou een samenspraak met een METC noodzakelijk zijn, om het alternatief, een voorstel voor een clinical trial, te onderzoeken en om op basis daarvan de conclusie te kunnen trekken, namelijk dat er voor de dierproeven al of niet een alternatief beschikbaar is.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De CCD waardeert de doortastende wijze waarop de DEC is ingegaan op de dilemma's aangaande het inzetten van proefdieren voor onderzoek naar een reeds geregistreerd medicijn en het doen van dierproeven voor de ontwikkeling van een behandeling tegen verslaving. Uw uitgebreide toelichting op deze punten is door de CCD ervaren als een waardevolle bijdrage bij de beoordeling van de projectaanvraag.</p>	

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The main objective of this project is to evaluate the effects of artemisinin on various aspects of nicotine and heroin self-administration and relapse.</p> <p>Opioid and nicotine addiction are chronically relapsing disorders that exert significant personal and social impact on society. There is a significant need for improved pharmacotherapies to treat these addictions. For instance, currently the most effective medication for nicotine addiction is varenicline (Champix). This drug was found to be effective in 30% of the users (Taylor et al. (2017) Intl J Epidemiology). All other medical therapies (e.g. bupropion, nicotine replacement) were found to be less effective.</p> <p>Specifically, we aim to address the following questions:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Does acute administration of graded doses of artemisinin reduce (a) the reinforcing and motivational effects of nicotine and heroin and (b) cue-, context- and drug-induced relapse following abstinence.</li><li>2. Does chronic administration of an effective acute dose of artemisinin during abstinence reduce the propensity to relapse to heroin and nicotine seeking?</li><li>3. Are the relapse-attenuating effects of artemisinin mediated by the dorsal medial prefrontal cortex?</li></ol>
-------------------------------------	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <p>In terms of scientific relevance, our study will contribute to a better understanding of the pharmacological mechanisms involved in nicotine and opioid addiction. In particular in relation to the role of GABA signalling in the reinforcing and motivational properties of opiates and nicotine and the role of the dorsal medial prefrontal cortex in relapse to opiate and nicotine addiction following abstinence. These experiments will generate novel findings on the effects of artemisinin on the addictive properties of opiates and nicotine, and such findings are of interest to the field of addiction and more generally to the fields of neuroscience.</p> <p>In terms of social relevance, a World Health Organisation (WHO) report in 2009 identified nicotine addiction as the leading cause of premature death and disabilities in the developed world (<a href="http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf">http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf</a>). WHO data indicate that there are more than 6 million annual deaths from smoking. The recent opioid crisis in the US is also a major concern with more than 70,000 deaths from overdose in 2017. Positive effects of artemisinin in our preclinical models of opioid and nicotine addiction could pave the way for new treatment strategies for these disorders. An advantage is that it concerns an already existing medication (malaria, cancer) with a low incidence of adverse side-effects. Unfortunately, no artemisinin-derivate is registered as a stand-alone medication in the EU and PO formulations are not available yet. Still, a proof-of concept in an animal study could strongly reduce the time and effort needed for approval and implementation of human treatment protocols. Our team has strong collaborations with human addiction researchers working in specialized addiction care centres in the Netherlands. Promising results with artemisinin will be discussed with our clinical partners and will form the basis of a collaborative grant application that aims to study the anti-addictive properties of artemisinin in human addicts.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DECadvies C7: 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. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met collega's in de academische wereld en andere instituten.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

### 3V's

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: The rat is the best (and most used) animal to study the pharmacological, psychological and neural mechanisms of nicotine and opioid addiction. Addiction is a complex disorder caused by interactions between the physiological effects of the drug and the neural mechanisms that control reward, learning, memory, and habit formation. Because of this, it is not possible to study these questions in less complex animals. In addition, such invasive experiments are not possible in humans. However, we feel that it is important to note that the types of processes we are studying have parallels with the human condition, for example nicotine and heroin-associated cues do induce craving in humans.</p>
<p>Verminderen</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size may result in much lower statistical power, potentially leading to meaningless results (reduced replicability). In addition, we have designed our experiment such that multiple outcome parameters will be studied in a single experiment to use the number of requested as efficient as possible.</p>

Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures:</b> Citaat: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthesia will be used during the surgical procedures. The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well trained and experienced researchers.</p> <p>The rats will be handled prior to surgery, to the behavioural training and to all injection procedures in order to reduce stress.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>	HEP: <2%	Citaat: We will observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment: - Loss of body weight: $\geq 15\%$ in 24 hour period. - Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their home cage - Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days - Tremors/convulsions from damaged intracranial canula - Self-damage after surgery or as a result from antinociceptive effects of heroin or artemisinin - Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

5.2 lid1

De dieren worden individueel gehuisvest. In 5.2 lid1

5.2 lid1

Ten eerste betreft het onderzoek waarbij proefdieren worden ingezet voor onderzoek naar mogelijke behandeling tegen verslaving aan nicotine en opiaten bij mensen. Deze verslavingen kunnen het gevolg zijn van vermijdbaar schadelijk gedrag/schadelijke keuzes en het ontstaan van een verslaving is initieel in een aanzienlijk deel van de gevallen mogelijk vermijdbaar. Toch komt de keuze tot middelengebruik niet altijd (geheel) vrijwillig tot stand en zijn er vele interne en externe factoren van invloed op het risico om een verslaving te ontwikkelen. De aanvrager geeft aan dat verslaving tegenwoordig als een biologische stoornis wordt gezien en met name het 'terugvallen' in een verslaving vaak geen vrijwillige keuze is. Ook wordt in het projectvoorstel terecht benoemd dat opiaten ook medicinaal worden voorgeschreven en dit steeds vaker in verslavingen resulteert.

Op basis van vergelijkbare argumenten is in de CCD vergadering van 15 mei besloten (zie notitie AVD20209667i\_CCD20-07-07) om verslaving (aan drugs) bij de beoordeling van projectvergunningaanvragen niet te beschouwen als eigen verantwoordelijkheid, maar als een ziekte waar mensen aan lijden die (mede) veroorzaakt wordt door zowel genetische als omgevingsfactoren en om aanvragen gericht op verslaving bij de ethische afweging niet anders te behandelen dan aanvragen gericht op lichamelijk en mentale ziektes.

5.2 lid1

Het tweede dilemma betreft de vraag of dierproeven noodzakelijk zijn om te onderzoeken of een geregistreerd medicijn met de werkzame stof artemisinin mogelijk kan worden ingezet voor een andere indicatie, of dat ook direct in mensen zou kunnen worden onderzocht. De DEC heeft hier vragen over gesteld en extern advies over ingewonnen bij het 5.1 lid2n METC. De antwoorden van zowel de aanvrager als de METC 5.2 lid1

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill, obscuring the text underneath.

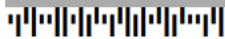
De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h  
5.1 lid2e  
5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 20209667  
**Bijlagen**  
3

Datum 24 augustus 2020  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 9 april 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209667. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 24 augustus 2020 tot en met 31 juli 2025.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2h 10 juli 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.



### *Nadere vragen aanvrager*

Op 26 mei 2020 en 10 augustus 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de noodzaak van dierproeven voor het behalen van de onderzoeksdoelen, de 3V's en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### **Datum:**

24 augustus 2020

### **Aanvraagnummer:**

AVD 5.1 lid2n 20209667

### **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

### **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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

24 augustus 2020

**Aanvraagnummer:**

AVD 5.1 lid2h 20209667

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**5.1 lid2h**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 augustus 2020 tot en met 31 juli 2025, voor het project "Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids" met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 20209667, na advies van <sup>5.1 lid2h</sup>

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is <sup>5.1 lid2e</sup>

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 april 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 10 juli 2020;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 augustus 2020;
  - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 10 juli 2020
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 2 juni 2020, 18 augustus 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Nicotine and heroin i.v. self-administration procedures</b>			
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	448	100,0% Matig

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 20209667

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

**Aanvraagnummer:**AVD 5.1 lid2h 20209667

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

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 24 augustus 2020 15:42  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209667

Geachte 5.1 lid2h

Op 09-04-2020 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Evaluation of artemisinin on the addictive properties of nicotine and opioids' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209667.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de noodzaak van dierproeven voor het behalen van de onderzoeksdoelen, de 3V's en de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 24-8-2020.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De CCD waardeert de doortastende wijze waarop de DEC is ingegaan op de dilemma's aangaande het inzetten van proefdieren voor onderzoek naar een reeds geregistreerd medicijn en het doen van dierproeven voor de ontwikkeling van een behandeling tegen verslaving. Uw uitgebreide toelichting op deze punten is door de CCD ervaren als een waardevolle bijdrage bij de beoordeling van de projectaanvraag.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl