

	Dossier: AVD11500202417980	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	de neurobiologie van anorexia nervosa
NTS-identificatiecode	NTS-NL-462891 v.1, 26-07-2024
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	leptine hyperactiviteit angst eetgedrag gewichtsverlies
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Anorexia nervosa is de meest dodelijke psychiatrische ziekte. Het leidt tot een enorme ziektelast voor patiënt en omgeving. Er is nog maar weinig bekend over wat er in de hersenen gebeurt bij anorexia nervosa, en als gevolg hiervan zijn er nog geen biologie-gebaseerde behandelingen gevonden. Doel van dit project is daarom de neurobiologie te ontrafelen die onderliggend is aan anorexia nervosa. Hiertoe gebruiken we diermodellen die aspecten van anorexia nervosa nabootsen, zoals hyperactiviteit, angst voor voedsel en verlies van lichaamsgewicht. Welke zenuwcellen zijn betrokken bij anorectische gedragingen als verlies van eetlust, rusteloosheid (hyperactiviteit) en angstig zijn voor eetmomenten? Wanneer zijn die cellen precies actief en hoe dragen ze dan bij aan anorectisch gedrag? We willen de activiteit van die cellen manipuleren met (activiteit kunstmatig beïnvloeden) met het doel te onderzoeken of die cellen misschien een aangrijpingspunten kunnen zijn voor therapeutische interventie, zoals een geneesmiddel dat precies die cellen beïnvloedt. We kijken ook of er in die cellen genen of eiwitten voorkomen waarvan we de werking kunnen beïnvloeden met gentherapie of met een geneesmiddel. Gentherapie is een behandelwijze waarbij de functie van een gen wordt veranderd, zoals een receptor voor een al bestaand geneesmiddel. Als we die vinden zullen we de effectiviteit ervan bepalen in het diermodel voor anorexia nervosa.</p> <p>Door de neurobiologie beter te begrijpen die onderliggend is aan deze anorectische symptomen die ook muizen en ratten laten zien na blootstelling aan dit diermodel voor anorexia nervosa denken we belangrijke stappen te zetten naar het mechanisme dat onderliggend is aan de ziekte en het ontwikkelen van een op neurobiologie gebaseerde behandeling die patiënten kan helpen hun eetstoornis te overkomen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Bij bijna alle ziekten waarvoor nu goede behandelingen voorhanden zijn, was het essentieel de biologie onderliggend aan die ziekte te ontrafelen. Bij anorexia nervosa is dat nog niet gebeurd. We beschikken over goede diermodellen voor anorexia nervosa in combinatie met hoogwaardige technologie die ons in staat stelt te bepalen welke zenuwcellen wanneer actief zijn tijdens anorectisch gedrag. Daardoor kunnen we stukjes van die neurobiologie ontrafelen. Dat is belangrijk, want als we weten waar in de hersenen tijdens blootstelling aan een diermodel voor anorexia nervosa het anorectisch gedrag ontstaat, is dat een eerste stap naar het ontwikkelen van een nieuwe behandeling. We kunnen dan bepalen welke cellen in die hersengebieden het anorectisch gedrag sturen en onderzoeken of er in die cellen aangrijpingspunten zijn voor geneesmiddelen. Omdat we de activiteit van die cellen kunnen manipuleren, kunnen we ook bepalen of het beïnvloeden van de activiteit van die cellen leidt tot minder anorectisch gedrag. Als we aangrijpingspunten vinden voor geneesmiddelen, dan kunnen we die testen op therapeutische effectiviteit. Op korte termijn zullen we meer inzicht krijgen in de neurobiologie. Er is een vooroordeel dat anorexia nervosa een welvaartsziekte is en dat het vooral psychisch is. Ons onderzoek zal bijdragen aan een beter begrip van de ziekte en dat er biologische kwetsbaarheden zijn die aangrijpingspunt kunnen worden voor de behandeling. Veel patiënten en hun familie vinden het prettig als ze weten dat anorexia nervosa niet alleen door de omgeving komt, maar dat er wellicht een kwetsbaarheid is die een biologische</p>

grondslag heeft. Op de langere termijn draagt dit onderzoek bij aan het ontwikkelen van therapieën die gebaseerd zijn op de onderliggende biologie. We verwachten niet dat zo'n op biologie gebaseerde behandeling de huidige gedragstherapie volledig zal vervangen. We verwachten wel dat een op biologie gebaseerde behandeling ondersteunend zal zijn en de effectiviteit van de huidige behandelingen zal versterken.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

De dieren worden blootgesteld aan het model voor anorexia nervosa (ook wel bekend als ABA-model). Dit betekent dat de dieren in een kooi gehuisvest zijn met een loopwiel of loopdisc. Dieren rennen graag in zo'n wiel of disc. Als we dieren vervolgens nog maar één tot drie uur per dag toegang geven tot voedsel, blijven ze veel rennen, met name in de lichtfase wanneer ze normaliter slapen. Door de combinatie van rennen (wat energie kost) en te weinig eten, verliezen de dieren lichaamsgewicht gedurende de week dat ze aan dit model worden blootgesteld.

De afgelopen jaren hebben wij een nieuw model geïntroduceerd om angst voor voedsel op te wekken. Angst voor het eten van voedsel typeert patiënten met anorexia nervosa. We hebben dieren daarom een protocol laten ondergaan waarin ze na het eten van een traktatie (chocolade) misselijk werden (door injectie met lithium chloride dat misselijkheid opwekt). Als ze daarna chocolade wordt aangeboden, zullen ze er niet van eten. Op dat moment wordt in deze dieren een conflict opgewekt (tussen honger en (niet) eten van "verboden" voedsel) zoals dat ook bij patiënten met anorexia nervosa optreedt. Dit model staat bekend als het 'geconditioneerde voedselvermijdingsmodel'. We ontdekten dat bij dieren die blootgesteld waren aan het ABA-model, en een sterke drang hebben om te eten, het nog langer duurde voordat het verboden voedsel gegeten werd dan bij dieren die het ABA-model niet hadden ondergaan. We verklaren dit als een veel sterker inprinten van negatieve gedachten rond eten bij zowel anorexia patiënten als ABA blootgestelde dieren. Dit biedt ons nu kansen het onderliggende mechanisme te ontrafelen.

Omdat we activiteit van cellen in kaart willen brengen en beïnvloeden, zullen veel dieren eenmalig onder narcose injecties krijgen met gemodificeerde onschuldige virussen. Dit geeft ons de mogelijkheid de activiteit van hersencellen te meten en te beïnvloeden. In sommige dieren zal dan ook eenmalig een glasvezelkabel of electrode worden geplaatst die ons in staat stellen neuronale activiteit te meten en te beïnvloeden.

Wanneer we geneesmiddelen willen testen op hun effectiviteit om anorectisch gedrag te onderdrukken, zullen de dieren deze geneesmiddelen eenmalig of herhaald (gedurende een week) toegediend krijgen via de mond, via injecties onder de huid of in de buik of direct in de hersenen.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

De gedragstesten zijn licht stressvol. Dieren worden in een verlichte arena of op een verhoogd platform gebracht. De onbekendheid en het licht geeft wat ongerief omdat het de (nacht)dieren angstig maakt. Als het gaat om voedsel dat nieuw voor ze is (zoals chocolade) geeft dat eerst wat angst omdat het iets nieuws is.

Voor veel proeven is het belangrijk vast te stellen hoe veel een dier precies eet en rent in het loopwiel. Dan moeten we dieren alleen huisvesten. Omdat ratten en muizen sociale dieren zijn, geeft het alleen huisvesten ongerief, omdat niet aan de behoefte van sociaal contact kan worden voldaan. Dieren zullen een operatie ondergaan waarbij zeer fijne meetapparatuur wordt geïmplanteerd. De operaties bij de dieren geven matig ongerief door de narcose en pijn na de operatie. Dit geeft alleen ongerief in de periode na de operatie (tot twee dagen na de operatie).

In het geval van injecties met geneesmiddelen is er licht ongerief door de injecties, dat duurt enkele seconden.

Bij blootstelling aan het anorexia (ABA) model zullen dieren maximaal 20% van hun lichaamsgewicht verliezen. Omdat wij veel ervaring hebben met dit ABA-model weten we de experimenten te stoppen zodat we alleen matig ongerief optreedt. We laten dieren niet meer dan 20% afvallen omdat ze dan zwakker worden en verschijnselen van uithongering gaan vertonen. Sommige dieren ondergaan mildere voedselrestricties waardoor het lichaamsgewicht niet meer dan 10% daalt. Dit maakt dieren fysiek en mentaal gezonder. Toch zijn er dan periodes waarin de dieren trek hebben en niet kunnen eten en dat geeft matig ongerief.

Sommige dieren krijgen een hersenimplantaat (met een buisje via waar we stoffen kunnen injecteren, een glasvezelkabel of een electrode). Dieren wennen hier snel aan. Op het moment dat dieren in de experimentele opstelling zijn, wordt de bewegingsvrijheid wat beperkt omdat er dan een flexibele kabel van de schedel naar de meetapparatuur loopt.

De lithium-injecties geven de dieren een gevoel van misselijkheid dat tot een uur aanhoudt. In sommige experimenten krijgen de dieren milde elektrische voetschokjes die niet pijnlijk zijn maar wel een vervelende schrikreactie geven. Ook het ongerief hiervan schatten wij in als matig.

Sommigen dieren die een hersenoperatie ondergaan worden de volgende dag dood aangetroffen ondanks dat we veel zorg besteden aan deze muizen na de operatie Omdat we de doodsoorzaak niet weten, is hier dan sprake van ernstig ongerief.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	5856	0	4104	1680	72
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	1980	0	1326	654	0

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1000	0	40
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	300	0	20

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

De meeste dieren zullen in het kader van de dierproef worden gedood omdat het hersenweefsel na de proef geanalyseerd moet worden. Waar mogelijk zullen we dieren aanbieden voor hergebruik. Dat is het geval als de dieren niet in het kader van de dierproef gedood hoeven te worden.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Hoewel we ook onderzoek doen met patiënten met eetstoornissen (erfelijkheids- en observationeel- en behandelonderzoek) zijn dierproeven essentieel voor het leggen van oorzakelijke verbanden tussen cellulaire processen in de hersenen en gedrag. Met apparatuur voor hersenscans kan niet de mate van detail zichtbaar gemaakt worden op het niveau van cellen, wat in het door ons voorgestelde onderzoek wel kan. We zijn van plan cellen uit bloed van patiënten te verzamelen voor toekomstig onderzoek. Op grond van het hier voorgestelde onderzoek in kunnen we in de toekomst hopelijk cellen van patiënten gebruiken die dezelfde eigenschappen hebben als de cellen die webestuderen in muizen. Het is op dit moment niet in te schatten of en in hoeverre dat zal leiden tot vervanging van dierproeven. Omdat we voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen kijken naar gedrag en de stofwisseling van het dier als geheel is het noodzakelijk dieren te blijven gebruiken voor dit onderzoek.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Via statistische analyses wordt bepaald hoeveel dieren er nodig zijn voor de analyse. Soms kunnen we de dieren hergebruiken. Dit vermindert het totaal aantal benodigde dieren drastisch. Indien mogelijk zullen we voor onze experimenten mannetjes en vrouwtjes gebruiken. We zullen meerdere experimenten met dezelfde dieren doen, waardoor het aantal benodigde dieren aanzienlijk wordt verminderd. In de meeste gevallen dient elk dier als zijn eigen controle.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Wij hebben voor de verschillende experimenten zoals, voor het blootstellen aan het ABA-model, eindpunten bepaald die er voor zorgen dat het ongerief niet groter wordt dan nodig voor het onderzoek. Daartoe letten we niet alleen op gewichtsverlies maar ook op lichaamstemperatuur, gedrag van het dier en de motivatie die het dier nog heeft om te eten. Vanwege de aard van de experimenten (dagelijks trainen) zullen de dieren regelmatig gezien en gecontroleerd worden. Dit zorgt er ook voor dat de dieren regelmatig in handen komen, en gewend raken aan interactie met de onderzoeker, wat leidt tot minder stress. Daarnaast zullen we individuele huisvesting tot een absoluut minimum beperken.

Alle dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Voor en na de operaties dienen we pijnstilling toe.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We gebruiken voor het onderzoek ratten en muizen bij voorkeur van een jonge leeftijd (vanaf zes weken oud) omdat anorexia nervosa vooral op jong volwassen leeftijd voorkomt. De eetstoornismodellen die wij gebruiken bootsen een aantal aspecten van eetstoornissen goed na, zoals de angst voor voedsel die we opwekken, de hyperactiviteit die ontstaat in het ABA-model en het daarmee gepaard gaande gewichtsverlies. Ook de hormonale veranderingen die optreden zijn vergelijkbaar met die in de mens.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-07-2030
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.5.202407081758 (c8043d7)Version date: 2024-07-08 17:59:09

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy_policy](#) | [Legal notices](#)



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, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

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 11500

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie UMC Utrecht

Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw

E-mailadres contactpersoon info@ivd-utrecht.nl

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing) Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw
n.v.t.

E-mailadres gemachtigde

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50

Postcode en plaats 3584CJ UTRECHT

Postbus, postcode en plaats 80125 3508TC UTRECHT

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.

Functie

Afdeling TN

Telefoonnummer

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[Redacted]	
	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	[Redacted]	
	Afdeling	TN	
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	Telefoonnummer	[Redacted]	
	E-mailadres	[Redacted]	
	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
	Functie	research analyst	
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Afdeling	TN	
	Telefoonnummer	[Redacted]	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	E-mailadres	[Redacted]	
	Telefoonnummer	030-2531569	
	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl	
	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 8 - 2024
	Einddatum (t/m)	- -
3.2 Wat is de titel van het project?	Neurobiology of anorexia nervosa	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	the neurobiologie van anorexia nervosa	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC-Utrecht
	Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

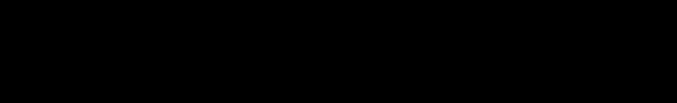

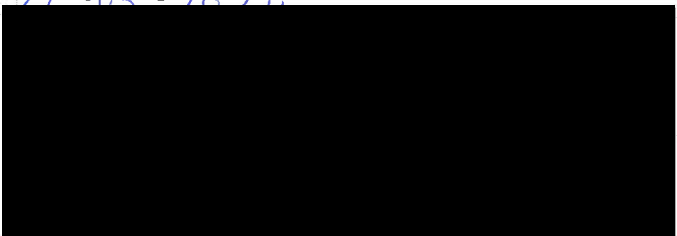
4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: UU-ASC		Afdeling:
	Straat:		Huisnummer:
	Postcode:	Plaats:	
	Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
E-mail: asc.factuur@uu.nl			
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer: CB.841910.3.01.011		

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	22-03-2024
Handtekening	



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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (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'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Neurobiology of anorexia nervosa

2 Categories

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

Societal problem Compared to other major psychiatric disorders, Anorexia nervosa (AN) is an under-researched, high burden eating disorder that severely impacts lifelong health and quality of life for millions worldwide (Schmidt 2016). It is a life-threatening eating disorder characterised by low weight, an intense fear of gaining weight, distorted body image, hyperactivity and severe self-imposed dietary

restrictions. Both genetic and environmental factors (such as stressful life events) play a role in the development of AN (Smith 2018). As medications are unavailable, the only validated therapeutic approach is intensive re-nutrition combined with psychotherapy over several months. Even with sufficient therapy, response rates are only ~50%. Consequently, mortality rates are the highest of any psychiatric disorder, often due to suicide (Puckett 2021).

Unmet need for better treatment and state of the art of human research

Biology-based treatments are not available due to the gaps in understanding the pathophysiology of eating disorders and a lack of biological targets. A recent genome-wide association study (GWAS) of anorexia nervosa (AN) suggests that it is a metabo-psychiatric disorder and shows genetic overlap with regulation of leptin levels and anxiety traits (Watson 2019). This supports a role of regulation of leptin in the susceptibility to develop AN and underscores the relevance to further study the role of leptin in AN. Leptin levels are extremely low in AN patients and are inversely associated with hyperactivity (Holtkamp 2006). Hyperactivity occurs in up to 80% in patients with anorexia nervosa and negatively impacts on recovery (Davis 1997). Hyperactivity and anxiety are linked as those AN patients that display hyperactivity also display high levels of anxiety (Sternheim 2015). Off-label leptin treatment of patients with anorexia nervosa reduces hyperactivity and in addition suppresses intrusive thoughts about food and dieting and improves mood (Milos 2020) and is therefore a potential treatment for AN. However, leptin also often causes hypoglycemia and reduces appetite and body weight, which provide a risk for patients with anorexia nervosa. How leptin acts to suppress hyperactivity is key towards unravelling neural circuitry underlying perpetuating pathogenesis in anorexia nervosa. The resolution of technologies (such as neuroimaging) in humans is insufficient to unravel neural circuitry at cellular level, which is essential to unravel the mechanism. As leptin is signaling positive energy balance, it is surprising that it has efficacy in the treatment of AN. A gap in knowledge is that it is unknown whether the role of leptin is unique and whether other satiety and feeding signals also impact on feeding and hyperactivity in AN.

Neuroimaging studies show that there are alterations in the neural processing of food stimuli. Human neuroimaging indicates disturbed connectivity between the hypothalamus and the reward system, but which precise pathways (at cellular circuit level) and how is unknown (Frank 2019, Murao 2017). The dopamine (DA) system has been strongly implicated in the neurobiological mechanisms underlying AN. Patients recovered from AN show reduced levels of the DA metabolite homovanillic acid in cerebral spinal fluid (Kaye 1999) and have increased DA D2/D3 receptor binding in the ventral striatum (Frank 2005). Data from another research domain suggest a link between leptin and alterations in the dopamine system: it has been demonstrated in patients with mutations in the leptin gene, that treatment with leptin normalizes the neural circuit (including dopamine-associated circuits) responses to food stimuli (Farooqi 2007). Also in rodents leptin modulates the activity of the dopamine system (van der Plasse 2015, Omrani 2021). Thus leptin impacts on dopamine activity but it is not known via which neural circuitry. As hyperactivity is associated with increased dopaminergic signaling and leptin suppresses both hyperactivity in an animal model for AN (see below) and the activity of the dopamine system, unraveling via which cells in which brain region leptin modulates dopaminergic activity is key to unraveling the mechanism underlying hyperactivity in the rodent model which we hypothesize to also play a role in hyperactivity in AN.

Taken together, genetics underscores the importance of biological factors (as leptin) in the development of AN. There is a gap in understanding how genetic factors and metabolic factors (such as hormones) impact on neural circuitry that underlies the susceptibility to develop AN. Unraveling this neurobiology is a fundamental step towards development of a biology-based (add-on) treatment for AN and animal

experiments are required to address the neurobiology of AN at cellular level as this is not possible in humans.

There are two types of anorexia nervosa in humans: the restrictive type and the binge purging type, but in practice the dividing line is not strict and there are periods when the same patient switches from one type to the other. The animal model we use specifically mimics the restrictive type. The restrictive type is the common and most severe form of anorexia nervosa where mortality is high and for which finding better treatments is urgent.

Animal models for anorexia nervosa

A recent systematic review discussed the use of the activity-based anorexia (ABA) which is the most frequently used model for AN (Scharner 2021, Schalla 2019). There are similarities between the ABA model and AN, such as the hyperactivity that develops, the physiological adaptations to starvation (loss of estrous cycle etc) and associations in the cognitive domain such as anxiety and cognitive inflexibility (Foldi 2023). There are also limitations: when exposed to food, animals in the ABA model will eat in contrast to AN patients. Also body image disturbance is not mimicked. Still the ABA model has translational value. In patients leptin levels are related to hyperactivity (Holtkamp 2006) and leptin suppresses running wheel activity (RWA) in the activity-based anorexia (ABA) model (Exner 2005, Hillebrand 2005). Based upon this work, metreleptin has been reported to have therapeutic effects in AN patients treated with this drug (Milos 2020, Antel 2022, Gradl 2023) but more mechanistic evidence is needed for a randomized clinical trial. Also the effects of olanzapine in AN patients and rats in the ABA model on hyperactivity are similar (Hillebrand 2005). In the ABA model, rodents are exposed to a scheduled feeding paradigm (i.e. food limited to only a few hours per day) and given access to a running wheel. Remarkably, despite reduced energy intake they increase their running activity, in particular in the light phase, such that they dramatically lose weight. Leptin suppresses this hyperactivity. It is unknown via which neurocircuitry leptin acts to reduce anorexia-associated hyperactivity. We will therefore address this gap by unraveling the neurobiology behind this persistent compulsive anorexic behavior (hyperactivity). Although food restriction is known to reduce anxiety (as measured in the elevated plus maze (EPM)), in the ABA model hyperactivity is associated with increased anxiety (Schwenzer 2022, Wable 2015), similar as in AN patients (Sternheim 2015, Holtkamp 2004). It seems that negative energy balance (as in AN and ABA) unmasks a relation between increased anxiety and hyperactivity, but what underlies it is unknown. ***Taken together, the ABA model mimics some aspects of AN and therefore provides an opportunity to unravel mechanisms at the cellular circuit level that underlie these aspects. In this project we focus on hyperactivity and its relation with anxiety as there is strong evidence that similar mechanism underlie these features in AN and in the ABA model.***

In the earlier CCD approved research (AVD115002015119 and AVD1150020198686) we demonstrated the efficacy of intranasal olanzapine in the ABA model and suggest that this may complement the treatment of AN to reduce restlessness (Kooij 2023), we used optogenetics and fiber photometry and unraveled how the mesolimbic system impacts on food-related decision making (Verharen 2019, 2020, Flores 2021, 2023) and reward consumption (Van Zessen 2021), we developed transcriptome analysis of specific populations of hypothalamic cells (Kakava 2022), characterized how orexin neurons target specific midbrain dopamine neurons (Kallo 2022), we introduced the TRAP2 mouse model to assess how ghrelin acts on hypothalamic neuronal ensembles (Stoltenborg 2022), we determined how leptin impacts on the dopamine system (Vrind 2019, 2021, Omrani 2021), we optimized viral tracing methodology (Roelofs 2021) and determined how leptin sensitivity impacts on the development of obesity (Git 2018, 2019). Our current projects build upon these discoveries and establishment of technologies. We are getting closer to unraveling how the dopamine system plays a

role in anorexic behaviors and what the role of (lack of) leptin signaling is and therefore now perform research more into this direction. Our unpublished data show alterations in the plasticity of midbrain dopamine and of GABA neurons upon exposing mice to the ABA model and these changes are likely influenced by leptin (as our in vitro data suggest (Omrani 2021)).

In our earlier work, we also explored the role of microbiome in the development of anorexic behaviors. Although depletion of the microbiome (by antibiotics) made animals more susceptible to lose weight in the ABA model, transplantation of stool from patients with anorexia nervosa compared to controls showed no difference in outcome of the ABA model. We therefore discontinued this work.

I also focused my research more to mechanisms underlying anorexia nervosa.

The role of the dopamine system

Rodent studies using the ABA model support a role for altered DA neuron activity in hyperactivity. Overexpression of D2 receptors in the ventral striatum makes female mice more susceptible to weight loss and more hyperactive when exposed to the ABA model (Welch 2019). Strikingly, this translates the importance of the DA binding studies mentioned above and suggests a causal role of altered DA signaling in hyperactivity. Running increases striatal DA release (Hattori 2015) and induces a hyperdopaminergic state (Greenwood 2019). We have shown that chemogenetic activation of neurons projecting from the ventral tegmental area (VTA) to the ventral striatum (more specifically to Nucleus Accumbens (NAc); VTA-DA→NAc) (Boender 2014) and of VTA-DA neurons (Boekhoudt 2018) results in hyperlocomotion, further supporting the idea that activation of this DA reward system results in hyperactivity. Mice that lack the DA transporter (DAT knockouts) are more vulnerable when exposed to the ABA model (Beeler 2020), supporting a role for increased DA in ABA-associated body weight loss. Chemogenetically activating the VTA→NAc in rats exposed to the ABA model did not impact on daily running (running was not further increased), but increased food intake and survival (Foldi 2017). To determine whether inhibiting this pathway during ABA affects survival in the model would be a logical next step. One recent study showed that VTA-DA neurons projecting to the Raphe are hyperactive upon ABA exposure and these neurons do not reduce their activity during feeding compared to non-ABA exposed mice (22). Chemogenetic inhibition of these VTA-DA neurons increased feeding but did not significantly impact on hyperactivity (Cai 2022), suggesting that this projection mediates reduced feeding.

Recently it was shown that the VTA→basolateral amygdala (BLA) controls anxiety in the EPM (Nguyen 2021, Morel 2022). It is well established that different DA projections control different functions. Although there seems to be a disbalance in the DA system in AN and in the ABA model, which of these different neuronal populations are affected and how they relate to maladaptive behaviors (such as hyperactivity and anxiety) in the ABA model is an important gap in knowledge. What causes the disbalance in DA activity is unknown, but decreased leptin signaling likely plays a role. In AN patients we and others found hyperactivity and anxiety to be associated (Sternheim 2015, Holtkamp 2004). To go beyond association and unravel underlying mechanisms, we propose to use the ABA model. *Taken together, unravelling how leptin and dopamine neural circuitry impact on anorexic behaviors, are timely and important issues as these are likely relevant to the development of anorexia nervosa.*

How does leptin talk to the dopamine system and why is unravelling this important to understand mechanisms underlying hyperactivity and anxiety?

There are several populations of leptin receptor (LepR)-expressing neurons. These include the arcuate nucleus agouti-related peptide and pro-opiomelanocortin neurons that play a major role in the effects of leptin on feeding and on glucose metabolism (Varela 2012). Relevant to this project, leptin also

We will compare this kind of “conditioned food anxiety” with food neophobia and with other tests for anxiety (such as the open field exploration and elevated plus maze) to explore whether these forms of anxiety have different or the same underlying mechanism(s).

Besides LepR-expressing DA neurons, we identified populations of leptin-sensitive neurons that indirectly affect the DA reward system. One population relevant to this proposal (since leptin injection into the VTA suppresses running in the ABA model (Omrani 2021)), are VTA-GABA neurons that express LepR. These neurons are depolarized by leptin and project onto VTA-DA neurons (i.e. leptin indirectly inhibits VTA-DA neurons via this pathway) (Leshan 2010). These neurons are inhibited when leptin levels are low, resulting in disinhibition of VTA-DA neurons. Chemogenetic activation of this population of neurons inhibits food reward seeking in conditions of negative energy balance when leptin levels are low (Omrani 2021). These neurons are therefore a candidate population to explain the increased activity of the DA system in ABA. ***Taken together, we hypothesize that the decrease in leptin upon ABA exposure is contributing to increased anxiety and hyperactivity via effects on the DA system in CeA and NAc.***

Recent unpublished data from our lab that open opportunities to further unravel neurocircuitry

We recently found that there are plastic changes in the electrophysiological properties of dopamine (increased firing) and GABA (reduced excitability) neurons in the midbrain. How these changes occur and whether (low levels of) leptin play a role is unknown. We also mapped which neurons get activated when mice are exposed to the ABA model using genetically modified mice (TRAP2) that allow genetic access to activated neuronal ensembles. We found several brain ensembles, and in one of them, the dorsomedial hypothalamus, chemogenetic manipulation demonstrated how activation and inhibition of these ensembles impacts on aspects of energy balance and on anxiety. Many of the other ensembles were not engaged when mice were treated with leptin. By treating mice with leptin we can thus identify which ensembles are no longer engaged and as leptin suppresses hyperactivity, which of those play a role in driving this hyperactivity.

Rationale of the direction of proposed research

Previous work has shown the relevance of (low)leptin and alterations in the dopamine system in driving anorexic behaviors in the ABA model (figure 2). This provides the basis to further unravel how leptin and the dopamine system play a role in the ABA model. Besides this approach, we now also have a second (unbiased) approach (using TRAP2 mice) to identify neuronal ensembles. Together, these approaches allow us to unravel the neurocircuitry that underlie anorexic behaviors such as hyperactivity and anxiety in the ABA and CTA models. Besides the ABA model, we introduced the CTA model in order to focus also on food anxiety, which is so relevant in the perspective of anorexia nervosa.

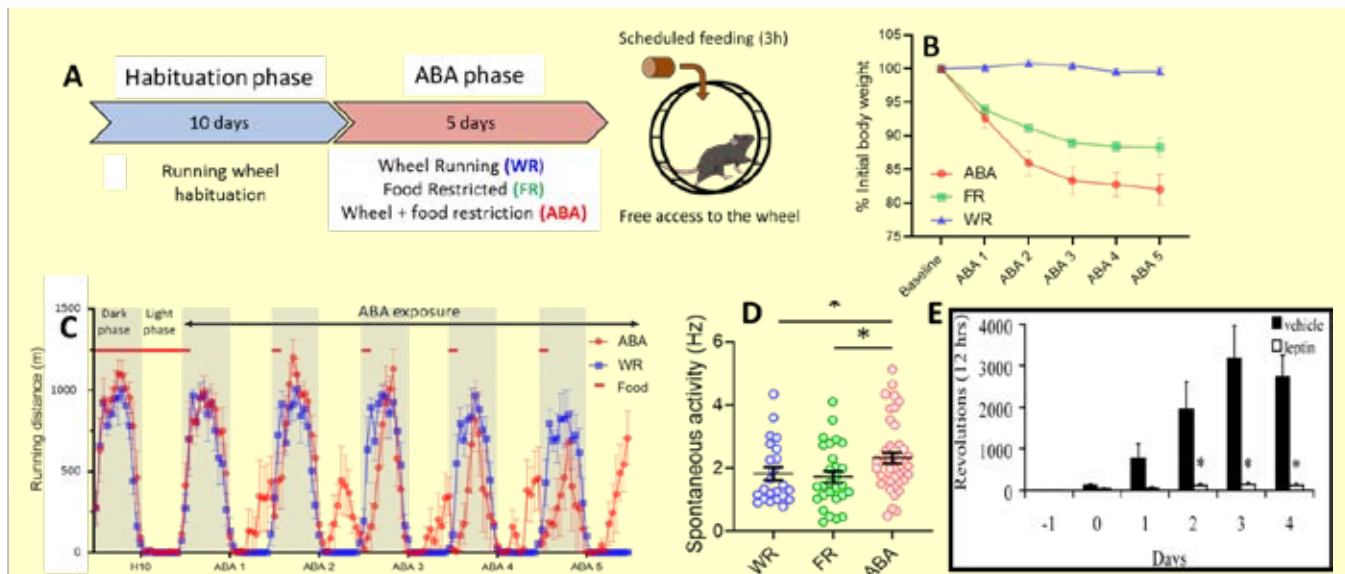


Figure 2: key findings using the activity-based anorexia (ABA model); A. schematic of experimental setup in mice; B. Body weight trajectories upon 5 days of ABA exposure compared to food restricted mice with no running wheels (FR) and mice fed ad libitum with running wheels (WR); C. In ABA mice, wheel running develops over days during the light phase; D. the firing frequency of midbrain dopamine neurons is increased in slices from ABA mice compared to controls; E. infusion of leptin strongly reduces light phase wheel running

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The overall goal of this project is to unravel the neural circuitry underlying anorexia nervosa and explore whether targeting this circuitry may have therapeutic potential. To do so, we focus on anxiety and on the hyperactivity that develops upon ABA exposure and the combination of ABA with CTA. Anxiety and hyperactivity are correlated in patients with AN and in rodents exposed to ABA (Schwenzer 2022, Wable 2015, Sternheim 2015, Holtkamp 2004).

By unravel the neurobiology underlying anorexia nervosa we aim to provide mechanisms upon which novel treatments can be developed.

We use two strategies to unravel these mechanisms. One is based on previous work showing that low levels of leptin and alterations in the dopamine system play a role in the development of anorexic behaviors. The second is based on using a genetic mouse model (TRAP2 mice) that allows us to identify neuronal ensembles that get activated upon exposure to the ABA and/or CTA models.

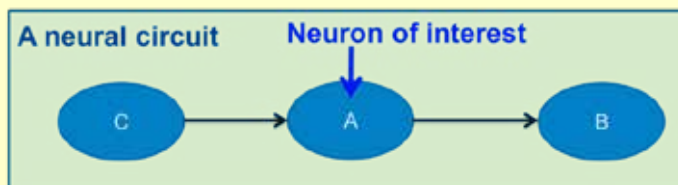
The immediate goals are to:

- (Q1) identify neural circuits that are engaged in anorexic behaviors (with a focus on hyperactivity and anxiety) in animal models (ABA and CTA),
- (Q2) record neuronal activity during behaviors relevant to anorexia nervosa and determine how they are affecting anorexic behaviors and
- (Q3) explore whether targeting these circuits decreases hyperactivity and anxiety and the susceptibility to lose weight upon exposure to the anorexia nervosa model.

Fig 3 overall project strategy

goal	Q1 mapping neurocircuitry	Q2 recording neuronal activity	Q3 function manipulation
techniques	TRAP2 mice, neuronal tracing scRNAseq	Electrophysiology and fluorescent sensors	Pharmacology, chemogenetics Gene targeting, optogenetics
purpose	Mapping active cells their connections and transcriptomal response	When are cells active	What role do cells play

This project provides the groundwork for development of biology-based (add on) treatments of anorexia nervosa.



3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Currently our work is supported by a Zwaartekracht grant (Brainscapes), two ENW grants and by charity funding from families with patients with AN. Previous work was also supported by Horizon grants and an ERA-NET grant. We are very well connected with international partners that we write grants together with on AN: P. Gorwood (Paris, psychiatry), S. Ehrlich (Dresden, psychiatry and neuroimaging), G. Breen (London, PGC-ED a world-wide genetics consortium for eating disorder), S. Dickson (Gothenburg, animal models), J. Hebebrand (Essen, psychiatry, leptin). In our department, we have our own animal facility and support staff of biotechnicians and animal. We have rooms for working with genetically modified animals (D-I) and viruses (DM-II), surgery rooms, rooms with behavioral setups, with electrophysiology and fiber photometry and rooms for breeding.. We have procedures in place to ensure animal welfare (besides diaries, we have bimonthly meetings dedicated to animal welfare and best practices). We have extensive experience (more than 25 years) in working with the ABA model in rodents. We have running wheel/disc cages for both rats (30) and mice (48). We have more than 10 years of experience in working with viruses, microinjection, opto- and chemogenetics and fiber photometry. Since 5 year we have experience with single cell transcriptomics. Thus we are experts in all the technologies that we propose to use in this project and in particular via the Brainscapes consortium connected with other experts in these technologies. We have already partially identified and targeted cells and neural circuits that are engaged during exposure to the anorexia nervosa model (work performed under AVD1150020198686 and AVD115002015119). We have recorded from this kind of cells both in vitro as well as in vivo. Using chemogenetics we already identified one population of neurons that when targeted rescued mice from starvation in the anorexia nervosa model. We already identified ligands (e.g. leptin) that counteracted some anorexic behaviors. We realise that we will not be able to fully unravel the neural circuitry underlying all aspects of anorexia nervosa, but it will be feasible within the timeframe of this project to unravel the neurobiology underlying some aspects of the disorder such as hyperactivity, food anxiety and reduced drive to eat.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Relevance

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

Societal relevance

Compared to other psychiatric disorders and based upon the number of research papers, Anorexia nervosa (AN) is an under-researched, high-burden mental and somatic disorder that has a severe impact on the health and quality of life of millions of patients and their caregivers in Europe. It is a life-threatening eating disorder characterised by low weight, an intense fear of gaining weight, distorted body image, and severe self-imposed dietary restrictions. Due to ineffective treatment, one third of cases become chronic and suffer permanent, irreversible mental and physical damage (Treasure 2015). This leads to devastating effects such as growth retardation, prolonged malnutrition, depression, anxiety and self-harm (Arcelus 2011). Suicide occurs frequently and mortality rates in anorexia nervosa are the highest of any psychiatric disorder (Sullivan 1995). Despite its high prevalence (lifetime of 1-4%) and burden, we still lack medicines that treat the core symptoms of this disorder. This is mainly due to a gap in our biological knowledge of anorexia nervosa. The only therapy is currently psychotherapy with response rates of ~50%. Unfortunately, intensive psychotherapy requires long hospital stays that severely affects the well-being and social participation of patients and caregivers and the psychiatric healthcare workforce.

Scientific relevance

Unravelling neurobiology of anorexia nervosa will enable identification of biology-based therapeutic targets. The primary impact of this project is scientific as we will generate fundamental knowledge on the role cells and neural circuits in the anorexia model. Unraveling the role of this neural circuitry does not have immediate societal impact. A better understanding of how alteration in cellular and circuit signaling is related to hyperactivity, to feeding and anxiety will be informative how to assist AN patients in their recovery with drugs that modulate the neurocircuitry. Both in AN patients and in animals exposed to the ABA model food anxiety is related to hyperactivity (Schwenzer 2022, Wable 2015, Sternheim 2015, Holtkamp 2004). Both increased anxiety and drive for hyperactivity may be caused by the low plasma leptin levels in AN and ABA, and rodent studies support that this involves an interaction of leptin with DA. The experiments we propose allow to unravel these relationships and provide fundamental knowledge underlying these symptoms that AN patients suffer from. The knowledge gained here will also increase the awareness that a peripheral hormone (leptin) can have a major impact on neurons that drive certain behaviors, some of which are important for psychiatric traits such as hyperactivity and anxiety in AN. Leptin levels are extremely low in AN patients and are inversely associated with hyperactivity (Holtkamp 2006). Hyperactivity is a persistent symptom of AN, which is difficult to control in patients and a major barrier to recovery as it interferes with weight gain and has been found to predict relapse and chronicity in large long-term follow-up studies (Carter 2004, Casper 2018). By unraveling how leptin reduces hyperactivity in the ABA model, we expect to identify cells and neural circuitry that drive this compulsive anorexic behavior, and within these cells identify drugable targets for further evaluation in a development trajectory for a biology-based improved treatment for anorexia nervosa. A better understanding of how leptin works in the context of anorexia also increases awareness that there is a metabolic regulatory component (low leptin) in AN in this psychiatric disease. So there is biology involved in this psychiatric disease which brings AN in another perspective allowing for development of a biology-based treatment which will assist AN patients in their battle to recover.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

1. Patients with anorexia nervosa and their loved ones are interested to find better therapies and understand that first more research needs to be done before these treatments become available.
2. Caregivers (health support staff) are interested as the treatment of anorexia nervosa often fails.
3. Our colleague scientist in societies as EDRS (eating disorders research society), SSIB (study section of Ingestive behavior) and ECNP (European college of Neuropsychopharmacology) are interested to learn from the results we produce
4. The animals, as they suffer mildly to moderately and have no benefit from being exposed to the protocols
5. The scientists involved in the project that have chosen a career in science to serve the human kind

More indirectly (long term): Pharmaceutical companies interested to develop drugs for eating disorders
Insurance companies currently spend a lot for the long treatment trajectories of AN and would welcome more effective and affordable treatments.

3.4 Strategy

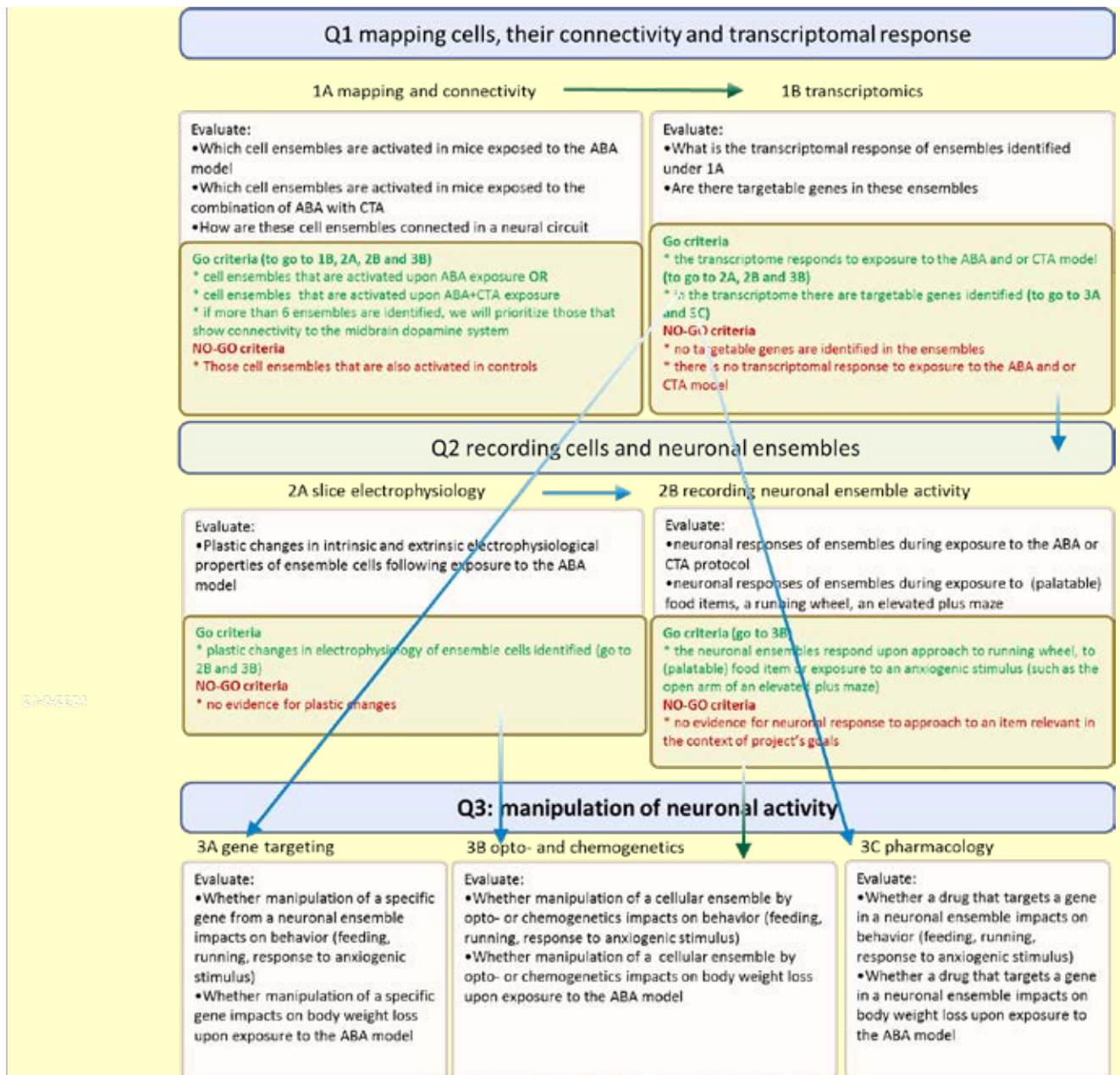
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

The strategy is based on achieving the best scientific results with a minimum of animals. To achieve this, an experiment is only started when the described milestones have been reached. We formulated GO/NO GO criteria in order to prevent unnecessary experiments from being carried out.

This is a renewal of an earlier CCD projects AVD1150020198686 and AVD115002015119. Based upon the progress we made and novel insights obtained (see above, 3.1) some procedures will not be performed anymore and some are new. The focus has been directed more onto neural circuits underlying the maladaptive behaviors in animal models for anorexia nervosa (the activity-based anorexia (ABA) model).

The eating disorder models we will use are the ABA model and the CTA model and their combination. With anorexic behaviors we mean behaviors that contribute to the development of eating disorders. These include running activity (hyperactivity), food exploratory behavior (anxiety), feeding behavior (anorexia) and cognitive flexibility (rigidity).

Genetically identifying neural circuits and the cells within these circuits, enables genetic access to these cells and circuits and allows to explore targetable genes (such as receptors). Genetic access allows us to not only specifically record from these cells (using electrophysiology and fluorescent imaging) but also manipulate them (e.g. with opto- and chemogenetics). This allows us to determine how these cells and circuits are impacting on anorexic behaviors. By targeting these cells and circuits with chemogenetics (and related technologies) we can explore the potential for therapeutically targeting these structures. When targetable genes are identified within these structures, we can explore whether targeting these genes (for instance with a drug) has therapeutic potential. The strategy is based on achieving the best scientific results with a minimum of animals. To achieve this, an experiment is only started when the described Go-NoGo criteria have been met.



The overall strategy is Q1 that we (further) map which neuronal ensembles are engaged in models of eating disorders (in particular for anorexia nervosa), Q2 that we record the activity of these ensembles and the ones we identified earlier and Q3 that we manipulate their activity. This project provides the groundwork for identifying and validating targets that may be developed for the treatment of eating disorders, such as metreleptin, which might become a new drug to treat anorexia nervosa as case reports show promising therapeutic effects (Milos 2020).

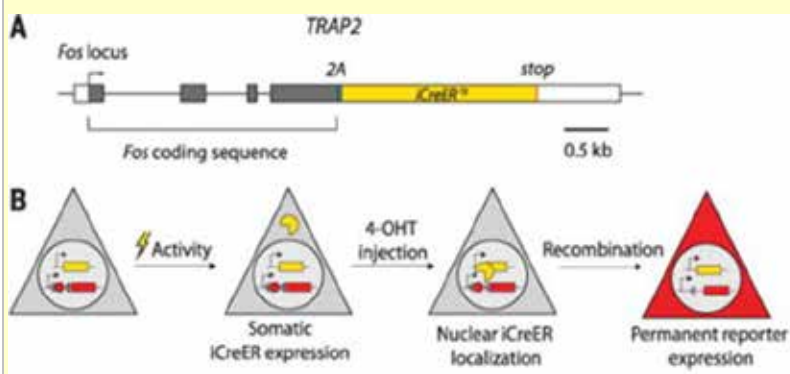
Q1 Mapping neuronal ensembles: this serves to identify where in the brain cells are active during exposure to an eating disorder model, to map the connectivity of these cells and to determine their genetic identity and their transcriptomic response.

1A. To map cells and circuits that get engaged during exposure to the eating disorder models. In most of our experiments TRAP2(Fos^{2A-iCreERT2})/TdTomato(Ai14) mice that are exposed to the activity-

based anorexia (ABA) model will be used. However where possible we will use mice that allow more specific targeting of subpopulations of neurons (such as for instance LepRcre mice or VGATcre mice), in case we already know that leptin receptor (LepR)- or GABA-expressing (VGAT) neurons are engaged in anorexic behaviors. TRAP2/TdTomato mice allow us to visualize cells (upon activation they will express the fluorophore TdTomato only in the condition than 4OH Tamoxifen has been injected) that are activated upon ABA exposure (fig 2).

Figure 2: in TRAP 2 mice the promotor of the activity marker gene Fos drives the expression of a tamoxifen-dependent (4OHT) cre recombinase. In case this mouse line is on a reporter gene background (in which TdTomato fluorescence expression is dependent on cre), a 4OHT injection following an event that triggers neuronal activity will result in permanent TdTom expression.

To identify and study the neuronal ensembles that are similar to those that are engaged when eating disorder patients are confronted with food, we use a rodent model and expose rodents to a conditioning paradigm where negative value is attributed to a (novel) palatable food. The conditioned taste avoidance (CTA) pathway has been partially mapped and engage parabrachial CGRP Neurons projecting to the amygdala (Chen 2018). Optogenetic activation of these neurons in the absence of taste



or nausea generated a avoidance memory. We hypothesize that AN patients hijack this powerful conserved pathway to avoid food by cognitively controlling these neurons. Therefore some animals will besides the ABA model also undergo a taste conditioning paradigm in which (short) palatable food exposure will be followed by an injection with LiCl to induce nausea.

This will induce a conditioned taste avoidance (CTA) which allows us to study food anxiety in an ABA context and map the engaged cells. Interestingly we found that if exposure to the CTA model is followed by exposure to the ABA model, the food avoidance memory lasts longer than in control mice. This resonates with the attribution of negative value to food items in AN patients and suggests that the mammalian mechanisms for (negative) value attribution to food are conserved and precipitated under conditions of negative energy balance.

As we know that (the lack of) leptin impacts on anorexic behaviors, in some animals we will inject leptin as we know that this silences part of the neural circuitry that gets engaged during ABA exposure. This allows us to unravel where in brain leptin acts to suppress hyperactivity and anxiety and helps to prioritize neuronal ensembles for further investigation.

GO CRITERIA:

We identified neuronal ensembles, visualized by more cFos activated fluorescent cells, that are engaged specifically in the ABA and/or CTA model and not in control groups (that are either only food restricted (FR) or exposed to a running wheel (RW)). These ensembles (up to 12) will be further investigated for mapping connectivity and for transcriptomics (1B). The “up to 12” ensembles is mainly based on the capacity of the group. We expect to find more than 12 neuronal ensembles, but based on the criteria mentioned below, we select those ensembles that we expect to play the most important role in influencing anorexic behavior. To justify further investigation of a neuronal ensemble it needs to be: 1. Specifically activated in the ABA model or ABA+CTA model and not in control groups and 2. Its transcriptome should respond to exposure to the ABA or ABA+CTA model. If more

than 12 ensembles are fulfilling these criteria, further prioritization is based on: 3. Administration of leptin suppresses the engagement of the ensemble and 4. The ensemble is connected to the dopamine system

NO-GO CRITERIA:

No further investigation of neuronal ensembles that are also engaged in running, in appetite in the absence of hunger or food restriction only.

Mapping connectivity: Using retrograde tracers injected near midbrain dopamine neurons (as we know increased activity of dopamine neurons underlies some of the anorexic behaviors (such as hyperactivity)), we will map which cells in these circuits connect (project) to the midbrain to further prioritize cells. Those cells that project to the midbrain will be prioritized for further studies. In case we want to map neurons that project onto neurons of interest, we will use Rabies virus (or similar tools) that allow to map monosynaptic input. This is for instance when we aim to map which leptin receptor expressing neurons project to midbrain.

Overall these experiments aim to map the neural circuits that are involved in anorexic behavior.

Milestone: brain map of neuronal ensembles engaged in ABA and ABA combined with CTA

GO CRITERIA: Up to six ensembles will be prioritized based upon connectivity to the midbrain and on the presence of leptin receptors

NOGO CRITERIA: no leptin receptors or no connectivity to the midbrain in ensembles

1B.To determine the transcriptome of candidate cells using snRNAseq to identify targetable

genes. For this we will use mice like TRAP2 mice crossed with mice that express TdTomato in the cell nucleus (Ai75D). From candidate regions we will isolate cell nuclei, use a FACS to identify fluorescent nuclei and perform snRNAseq we will determine the transcriptome of these cells using snRNAseq to identify targetable genes. Similar as in A.1. we will expose mice to the ABA(/CTA) model and after 40H Tamoxifen injection let them recover for a few days. We will then expose these mice either to a running wheel while fed ad libitum, or re-expose them to the ABA(/CTA) model. In some experiments, following re-exposure to ABA we will inject leptin (as we know that leptin impacts on anorexic behaviors this provides insight into the mechanism via which leptin does so). We will then isolate brain nuclei and perform snRNAseq. These experiments will not only reveal the identity of these neurons, but will also determine how the transcriptome changes upon exposure to the ABA(/CTA) model and leptin injections. Bioinformatics will be used to search for targetable genes and to explore in which cells genes are enriched that are associated with eating disorders.

Based upon the results we will proceed with further investigating the role of these ensembles (for Q2 and Q3) and of targetable genes (for Q3).

GO CRITERIA: we identify ensembles that show an enrichment of genes associated with eating disorders

NOGO CRITERIA: there is no transcriptomal response to exposure to the eating disorder model, suggesting that identified ensembles are not involved in eating disorders

GO CRITERIA: we identify targetable genes

NOGO CRITERIA: there are no targetable genes discovered.

Milestones: unraveling the genetic identity and transcriptomal response of cells in neuronal ensembles and identification of targetable genes.

Go decision criteria: for further studies we will prioritize up to six neuronal ensembles based upon their connectivity to the brain reward system, their responsiveness to leptin and their enrichment in genes associated with eating disorders. Only in case genes are identified (such as receptors) that are targetable by drugs we will explore these under Q3.

Q2. Recording cells and neuronal ensembles This serves to determine plastic changes due to exposure to eating disorder models using slice electrophysiology ex-vivo (2A). We will also record neuronal activity in vivo using electrophysiology and fiber photometry. This allows us to determine when these neurons are active during expression of anorexic behaviors (2B). Experiments under 2A and 2B determine whether these neuronal ensembles indeed are involved in behaviors that underlie eating disorders. 2A and 2B are complementary to each other and not dependent on each other.

2A. Is neuronal activity altered by exposing mice to an eating disorder model for specific populations of neurons and affected by leptin?

Besides the neuronal populations discovered under Q1, we will in particular focus on the midbrain dopamine system and connected neurocircuitry for which we already have strong evidence for engagement in the ABA model from earlier research and that fall within the GO criteria for Q1 (connected to midbrain dopamine neurons and engaged in the ABA model). We will record from up to five different neuronal populations.

We will use ex-vivo electrophysiology and record from neurons we identified in Q1 and based upon earlier work and determine whether exposure to eating disorder models results in plastic changes in neuronal signalling.

Milestone: These experiments will reveal whether DA neurons projecting to for instance the NAc and/or CeA display increased firing following ABA exposure and whether leptin normalizes this activity.

GO CRITERIA: For other projection neurons or genetically identifiable neurons discovered during the project similar approaches will be used based upon prioritization indicated under Q1.

NOGO CRITERIA: no plastic changes are found in electrophysiological properties

2B. How is neuronal activity of specific neuronal populations and neurotransmitter (DA) release in different neuronal projections related to feeding, running and anxiety in the ABA model?

A second approach is to assess when neuronal ensembles change their activity during exposure to eating disorder models using fluorescent probes that measure transmitters (such as dopamine) and signal transduction molecules (such as calcium using fluorescent sensors as GCAMP). As alternative approach we will use in vivo electrophysiology and capture neuronal firing to assess changes in neuronal activity. In experiments for Q1 eating disorder models refer to the activity-based anorexia model and conditioned-taste avoidance. In experiments for Q2 we investigate the different aspects within these models and focus on for instance food approach behavior, running, exploratory behavior and anxiety as the goal there is to determine in which aspect of eating disorder behavior neuronal ensembles are engaged.

Here we address a gap in knowledge regarding how for instance DA release in different VTADA projection areas is related to running and anxiety in the ABA model. To measure anxiety we have introduced a food anxiety paradigm in the ABA model. In AN patients, premeal anxiety inversely correlates with food intake (Lloyd 2021). To mimic food anxiety in mice, we introduced a conditioned taste avoidance (CTA) paradigm. In CTA, intake of novel palatable food (e.g. chocolate) is followed by a single injection of lithium chloride (LiCl) which induces nausea (Chen 2018). Upon re-exposure to the same palatable food, mice will avoid the intake of that food, which can be quantified by determining the latency to approach the food and the amount of food eaten. CTA increases activity of parabrachial neurons projecting to the CeA (Chen 2018), underscoring the relevance of the CeA in food anxiety. Similar to AN patients, in CTA negative value is attributed to (non-toxic) food. CTA has been validated as an anxiety test (Cryan 2011) but has never been studied in combination with exposure to the ABA model. We successfully combined CTA with ABA and found that there was a clear relationship between the strength of the aversive stimulus (dose of LiCl) and latency to approach and

amount of chocolate eaten; this was even stronger for those mice that lost as much as 20% of body weight in the ABA model, as they showed a delayed approach to and ate less chocolate. The combination of CTA with ABA (CTA-ABA) allows us to study how neuronal activity is related to running and anxiety in the same animal and is a novel approach. Besides looking into the activity of the dopamine system, we will also determine the activity of leptin receptor expressing neurons and neuronal ensembles we identify in experiments under A (Q1) above.

Milestone: These experiments will reveal how DA release in for instance CeA and NAc is related to avoidance/anxiety (chocolate), to food (chow intake) and to initiation of running.

GO CRITERIA: only for those ensembles that respond to exposure to anxiogenic stimuli or (palatable) food items or running in the ABA model we will test the requirement of these ensembles (as in Q3).

The specific criteria to prioritize ensembles for studies in Q3 are: 1. There are plastic changes in their electrophysiological properties (2A) or gene expression (1B); 2. they are active (2B) during feeding, locomotor activity or challenges that induce anxiety. Up to six ensembles that fulfil the most of these criteria will be further investigated in Q3.

NOGO CRITERIA: no evidence found for engagement of ensembles in anorexic behavior

Q3. Manipulating neuronal activity Using opto- and chemogenetics allows us to manipulate the activity of neurons during exposure to models of eating disorders. Besides these genetic approaches we can also manipulate neuronal activity by using ligands (such as agonists and antagonists) that target proteins (such as receptors) expressed in these cells. Another approach to manipulate activity is to remove targetable genes, such as the leptin receptor, from specific neuronal populations using CRISPR/Cas or the cre-loxP system. These technologies are essential to determine causality between (targeted) genes and neuronal ensembles on one hand and phenotypes (behavior) on the other.

3A. How are targetable genes related to AN? Genes like the leptin receptor gene are expressed at various cell populations. In order to unravel where in the brain therapeutic effects are mediated we will delete targetable genes such as leptin receptors from candidate ensembles and determine whether peripheral administration of leptin still reduces hyperactivity when these mice are exposed to the ABA model

Milestone: We expect this to identify leptin sensitive cells that are engaged in mediating the effect of leptin on hyperactivity.

: Similar approaches will be used in case we identify other targetable genes

3B. Can anorexic behaviors be prevented by optogenetics or by long-term chemogenetic manipulation?

We will address whether short term optogenetic and long term chemogenetic inhibition of specific neurons modulates feeding, running and food anxiety in the CTA-ABA model and whether this manipulation impacts on body weight loss. We will use opto-and chemogenetics to control activity of these neurons.

Milestone: Using chemogenetics we expect to reveal whether continuous inhibition of DA projection neurons counteracts the development of increased running, food anxiety and reduces body weight loss in the ABA model.

We will also explore the role of leptin-sensitive neurons in mediating behavior in ABA mice. As the lack of leptin is associated with increased (food) anxiety and running, we will determine to what extent LepR-expressing neurons play a role in anxiety and running in the ABA model.

Milestone: We expect chemogenetic inhibition of VTA_{LepR/DA} neurons to reduce food anxiety in the ABA model. We will also discover how this impacts on running (as Stat3 removal (a downstream mediator of leptin receptor signalling) increased running in sedentary male mice (Fernandez 2015)) and

feeding. We expect activation of $VTA_{LepR/GABA}$ neurons to reduce running and possibly reduce food anxiety and increase food intake.

Decision point: for other prioritized ensembles identified in Q1 we will use similar approaches based on the described criteria.

In case we aim to understand whether activity of neuronal ensembles is directly impacting on behavioural output, we will use optogenetics. To address whether a specific neuronal ensemble is impacting directly on the expression of anxious behavior, eating or running, we will optogenetically manipulate neuronal activity while observing behavior and recording neuronal activity.

Milestone: These experiments allow us to determine whether DA release is required (using Jaws inhibition) for expression of food anxiety and running and whether it enhances (using Chrimson stimulation) these behaviors.

if we identify other neuronal ensembles based on criteria described under Q1 we will use similar strategies to determine their engagement and requirement for eating disorder behaviors.

3C: validating drug targets. Besides drug targets for eating disorders that we identified previously (such as leptin and ghrelin receptors), in the course of the project we expect to identify new targetable genes (such as receptors and enzymes that we identify addressing Q1) that we can target with gene therapy approaches or ligands (including drugs).

We will use techniques as Crispr-cas or CreLoxP recombination to manipulate gene function in case there are no drugs available that target the genes of interest.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The overall strategy is Q1) that we map which neuronal ensembles are engaged in models of eating disorders (in particular for anorexia nervosa), Q2) that we record the activity of these ensembles and Q3) that we manipulate their activity. Some of the neuronal ensembles were already identified by us and others previously and therefore we could describe clear examples of experiments under Q2 and Q3. The project is primarily fundamental in nature, as we aim to unravel mechanisms in animal models that we expect also underlie some of the symptoms in anorexia nervosa (such as hyperactivity and anxiety). Therapies can be developed based on these mechanisms.

The research described under Q3 is translatable to a greater or lesser extent. If we find that a drug is effective in suppressing anorexic behavior, this opens the possibility of investigating whether it can become a therapy in humans. If we find that anorectic behavior is suppressed by the genetic modification strategies we use (modifying gene activity or chemogenetics), this is less translatable because gene therapy in humans still needs to be further developed (but that is now happening very quickly).

3.4.3 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	Exposure to anorexia nervosa models with the purpose to map circuitry and to record and manipulate neuronal activity
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.

7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (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'.

11500

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

UMC Utrecht

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Exposure to anorexia nervosa models with the purpose to map circuitry and to record and manipulate neuronal activity

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The experiments described in this appendix aim to unravel how specific neuronal ensembles and selective targets within these neuronal ensembles impact on the development and maintenance of anorexic behaviors, that occur in models of eating disorders (such as to the activity-based anorexia model)

To reach this overall aim, we defined 3 specific research questions. Each research question is linked to an experimental code that corresponds to one of these models indicated in the figures.

Q1: to map neuronal ensembles involved in (models of) anorexia nervosa- this is a descriptive part of the project

Q2: when are neuronal ensembles active during exposure to anorexia nervosa models- the outcomes are neuronal responses related to anorexic behaviors

Q3: how does manipulation of neuronal ensembles impact of anorexic behaviors – primary outcomes of this are effects on food intake, anxiety and running activity

Q1: to map neuronal ensembles involved in anorexia nervosa

Addressing Q1 entails two overall strategies: A) one is aimed at mapping which neuronal ensembles are involved and what neural networks these neuronal ensembles are embedded in and B) what is the genetic identity and the transcriptomal response of these ensembles upon exposure to eating disorder models.

1A. To map cells and circuits that get engaged during exposure to the ABA model.

primary outcome: visualization of cells that get activated upon exposure to the AN models and controls

TRAP2(Fos^{2A-iCreERT2})/TdTomato(Ai14) mice are exposed to the activity-based anorexia (ABA) model (Fig 1a). TRAP2/TdTomato mice allow us to visualize cells (upon activation they will express the fluorophore TdTomato only in the condition than 4OH Tamoxifen has been injected) that are activated upon ABA exposure (Fig 1a). The ABA model is a well established model for anorexia nervosa.

We know that the hyperactivity that occurs upon exposure to ABA is suppressed by leptin and associated with anxiety. We will therefore map which of the identified ensembles are dependent on the decrease of leptin, by administering leptin before giving 4OH Tamoxifen (Fig 1a). This will help to specify the ensembles that we prioritize for further investigation. To unravel the relationship between anxiety and hyperactivity, we will expose mice to CTA and ABA and map which ensembles will increase (Fig 1b). This will enlighten which ensembles are engaged in food anxiety. In order to control for neurons activated by food restriction, by running wheel activity (fig 1c) and by neurons that encode appetite rather than hunger we will run separate groups of mice with a running wheel or food restriction only (Fig 1c) and animals that are mildly food restricted (not losing more than 10% of body weight) and that receive a familiar palatable food before trapping (Fig 1d).

For these prioritized ensembles we will determine to which neuronal circuits they project (using anterograde tracers (such as channelrhodopsin) and retrograde tracers injected in putative projection targets) and from what brain regions they receive input (using retrograde tracers as Rabies virus) (fig 1e).

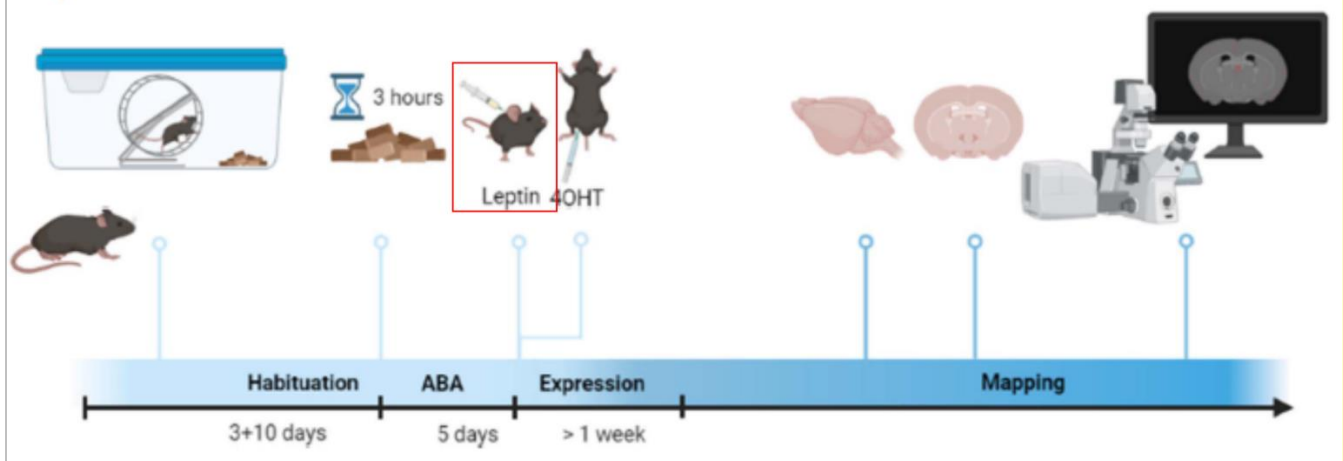


Figure 1: A timeline of mapping activated cells upon exposure to the ABA model, with leptin or vehicle injections (red box means optional)

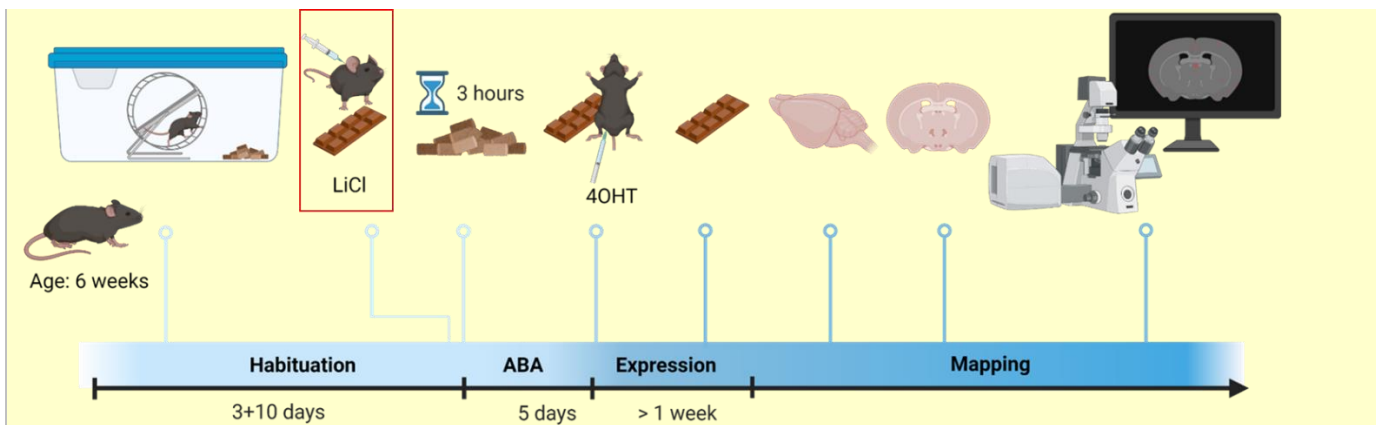


Figure 1:B timeline of mapping activated cells upon exposure to the ABA-CTA model, in case we specifically look at CTA only, the mice will have access to running wheels without food restriction (in stead of the period now indicated as ABA) (red box means optional: controls are not injected with LiCl but will get chocolate))

I here give an example of how we address where these ensembles project to: Using retrograde tracers injected near midbrain dopamine neurons (as we know increased activity of dopamine neurons underlies some of the anorexic behaviors (such as hyperactivity)), we will map which cells in the identified ensembles connect (project) to the midbrain to further prioritize cells. In case we want to map neurons that project onto ensemble neurons, we will use Rabies virus (or similar tools) that allow to map monosynaptic input.

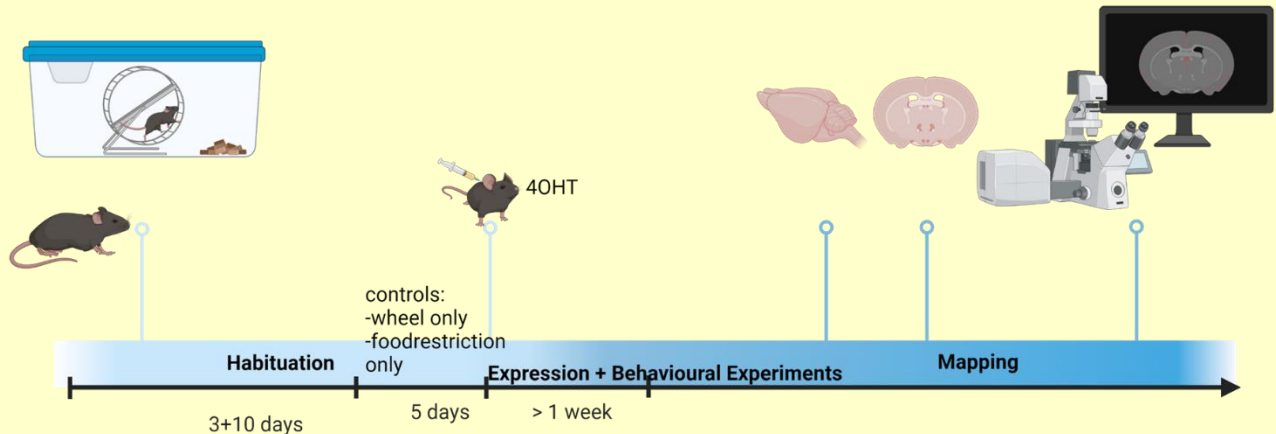


Figure 1:C timeline of mapping activated cells in controls to correct for presence of a running wheel or for food restriction

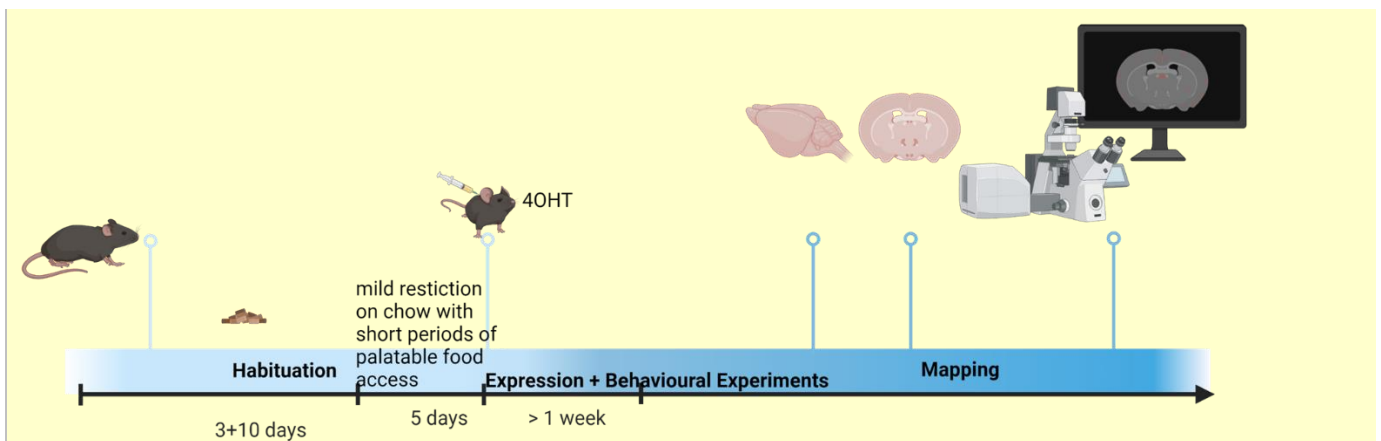


Figure 1:D timeline of mapping activated cells in controls to correct for appetite rather than hunger

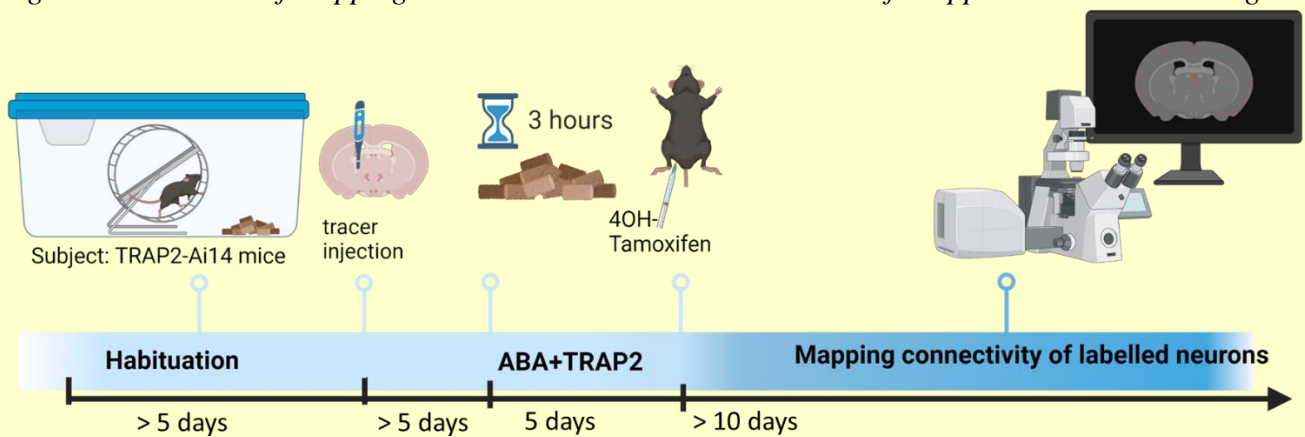


Figure 1E: Time line for mapping how activated cells are connected to other brain regions (as VTA) **1B .To determine the transcriptome of candidate cells using snRNAseq to identify targetable genes. primary outcome:** identification of the transcriptomal response of neuronal ensembles

For this we will use TRAP2 mice crossed with mice that express fluorophores such as TdTomato in the cell nucleus (Ai75D) and expose them to eating disorders models similar as in 1A. From candidate regions identified in 1A, we will isolate cell nuclei, use a fluorescent-activated cell sorter (FACS) to identify fluorescent nuclei and perform snRNAseq to determine the transcriptome of these cells using snRNAseq to identify targetable genes (Fig 2a).

Similar to A.1. we will expose mice to the ABA(/CTA) model and after 4OH Tamoxifen injection let them recover for a few days. In some experiments, we will re-expose the mice to the condition with which cells were TRAPed, thus for instance again to ABA (fig 2b). We will then isolate brain nuclei, FACSort them and perform snRNAseq. These experiments will not only reveal the identity of these neurons but will also determine how the transcriptome changes upon exposure to the ABA(/CTA) model and leptin injections. Bioinformatics will be used to search for targetable genes and to explore in which cells genes are enriched that are associated with eating disorders.

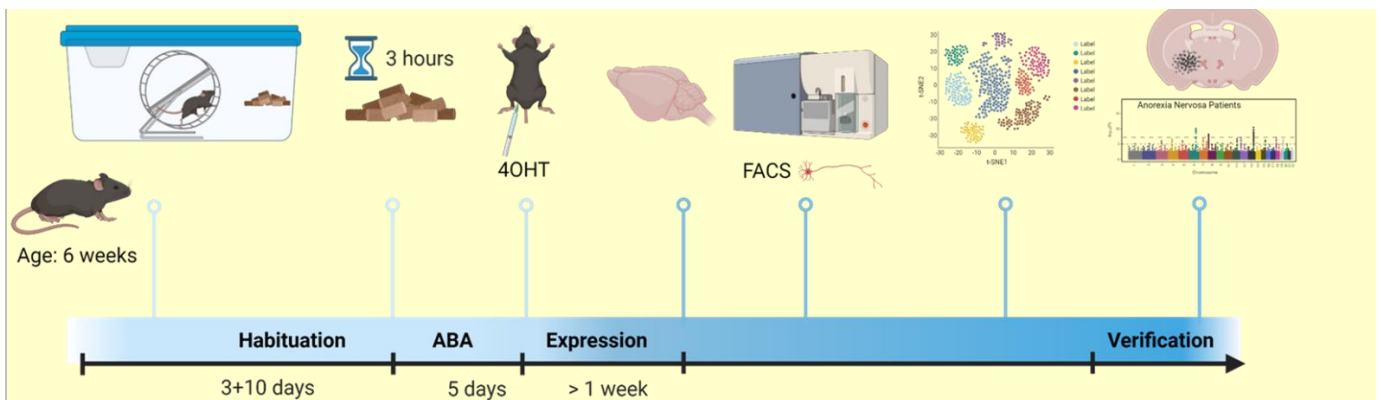


Figure 2a timeline for isolating activated cells from TRAP2 mice for scRNAseq

The purpose of addressing Q1 is to discover genes and neural circuits that underlie the development of eating disorders. These genes and neural circuits will be further explored in Q2 and Q3.

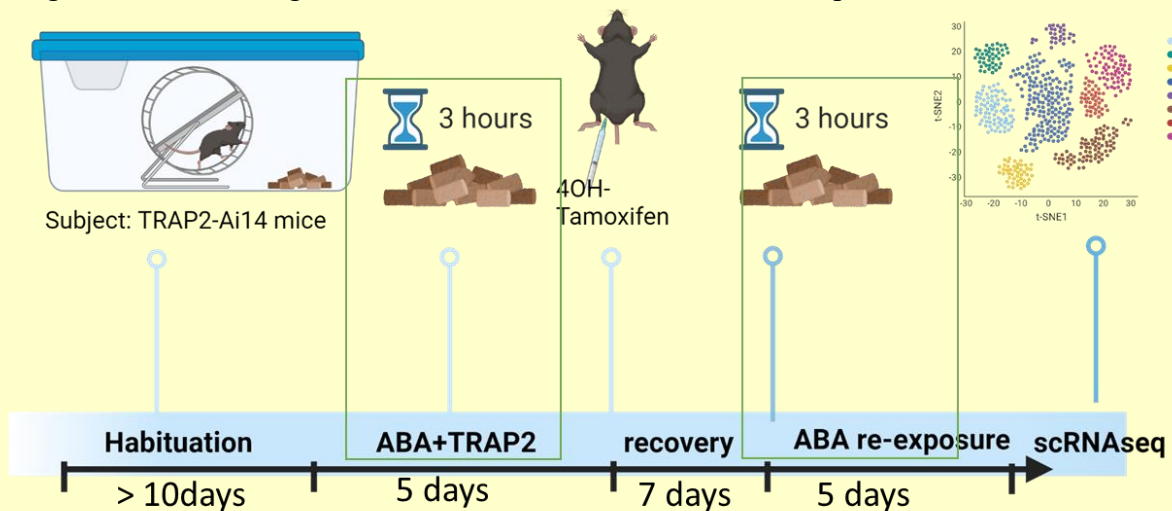


Figure 2b Similar timeline as in 2a for isolating activated cells from TRAP2 mice re-exposed to ABA for scRNAseq. The green boxes are exchangeable for TRAPing ensembles under other conditions such as ABA+CTA, in which case the mice will be re-exposed to the same condition to determine changes in gene expression.

Q2: Which and when are neuronal ensembles active upon exposure to anorexia nervosa models?

We will address this using two approaches. One is in vitro in brain slices, where we determine which populations of neurons display plastic changes as a consequence of exposure to AN models. These plastic changes mark the engagement of these neurons in AN.

2A . Is neuronal activity altered by exposing mice to an eating disorder model for specific populations of neurons and affected by signal molecules or drugs like leptin? We will in particular focus on the midbrain dopamine system and connected neurocircuitry.

Primary outcome is a change in the electrophysiological properties of the investigated neurons.

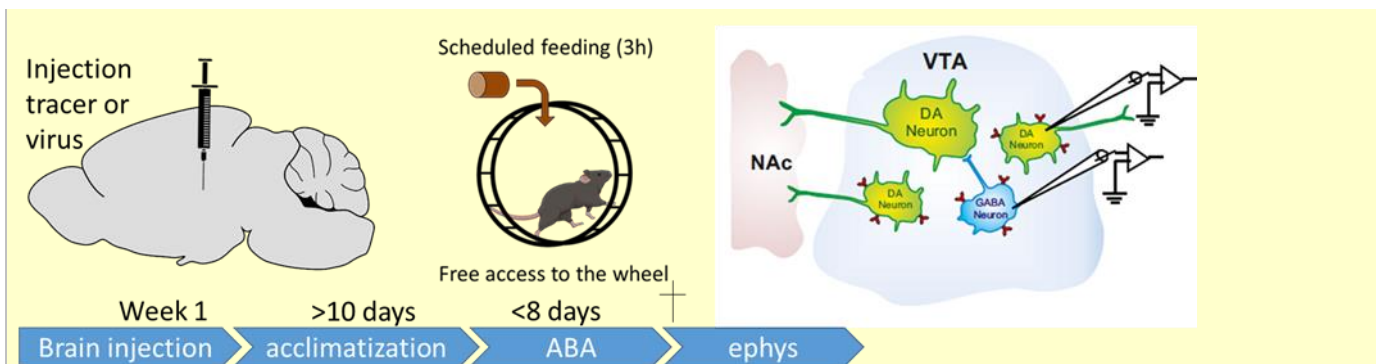


Fig 3 Timeline of experimental setup for electrophysiology

The neuronal cell populations we investigate here are based upon results from previous work where we identified candidate neuronal populations (an example is given below) and on results from Q1. In a typical experiment, PTX3GFP mice (in which midbrain DA neurons express green fluorescent protein) will be injected with green (in NAc) and red (in CeA) retrobeads (or with other retrograde tracers) and exposed to the ABA model (fig 3). Controls will only be food restricted or have a running wheel while ad libitum fed. At the onset of day 5 of ABA exposure (mice then display clear hyperactivity), mice will be killed for electrophysiological recordings in brain slices and a blood sample will be taken to relate leptin levels with firing rate, weight loss and running. We will test whether the increased firing of dopamine neurons we found before is specific for certain projections such as to NAc. The spontaneous firing frequency of VTA→NAc and of VTA→CeA will therefore be determined in GFP+ (DA) neurons that have green or red retrobeads (projection specificity; retrobeads are easily dissociated from GFP with fluorescence microscopy). These experiments will be repeated but then in mice injected with leptin 4 hrs before killed as this treatment is known to suppress running. These experiments will reveal whether DA neurons projecting to the NAc and/or CeA display increased firing following ABA exposure and whether leptin normalizes this activity. For other projection neurons or genetically identifiable neurons discovered during the project similar approaches will be used.

2B How is neuronal activity of specific neuronal populations and neurotransmitter (DA) release in different neuronal populations related to running and anxiety in eating disorder models?

Primary outcome here is the neuronal response time-locked to a behavioural event related to anorexic behavior.

Fiber photometry (preferred method)

Measuring neuronal activity will be done with a technique called fiber photometry where we inject a Gcamp (genetically encoded calcium indicator) virus or another virus that allows to record another signal transduction pathway or transmitter (such as dopamine using Dlight or GRABDA as sensors) in specific brain areas, which enables us to measure neuronal activity in awake animals. Neuronal depolarization will result in for instance an increased cellular calcium or dopamine level, which changes the fluorescence signals that is captured by the fiber optic tip. To measure the neuronal activity an optic fiber will be implanted in the same or a second surgery (in some brain areas later implantations showed better signal). During measurements animals will be connected to a cable and are able to freely move in the test set-up. With fiber photometry we measure transmitter release or neuronal activity of specific neurons in the area we implanted the fiber (either injection area or projection area).

Minilens and in vivo electrophysiology recordings using optrodes (only in case higher resolution is required)

Another approach of measuring neuronal activity is calcium imaging where also a Gcamp virus is injected but in this case a **minilens** is implanted. For the minilens implantation it's important that the Gcamp virus is already expressed, this takes 2-4weeks. The minilens will be implanted in a second surgery. The

animals need a third anaesthesia to connect a baseplate to the skull, this surgery is non-invasive. During measurements animals will be connected to a cable and are able to freely move in the test set-up. With calcium imaging we measure activity of individual neurons near the minilens within one measurement. A third approach is to implant an **optrode** which allows to record electrical activity while simultaneously stimulating specific neuronal activity with light pulses in freely moving animals. The preferred method to record from specific neuronal ensembles is fiber photometry as the weight of fiber optics is very low and therefore not a burden to the animal. However in cases the ensembles are formed by functionally distinct neuronal populations, we need to be able to dissociate these different populations. In that case we will use minilenses in case we record activity from neurons which activity can be monitored using fluorescence. In case fluorescence cannot be used to record neuronal activity, we will use optrodes which allow to record electric activity.

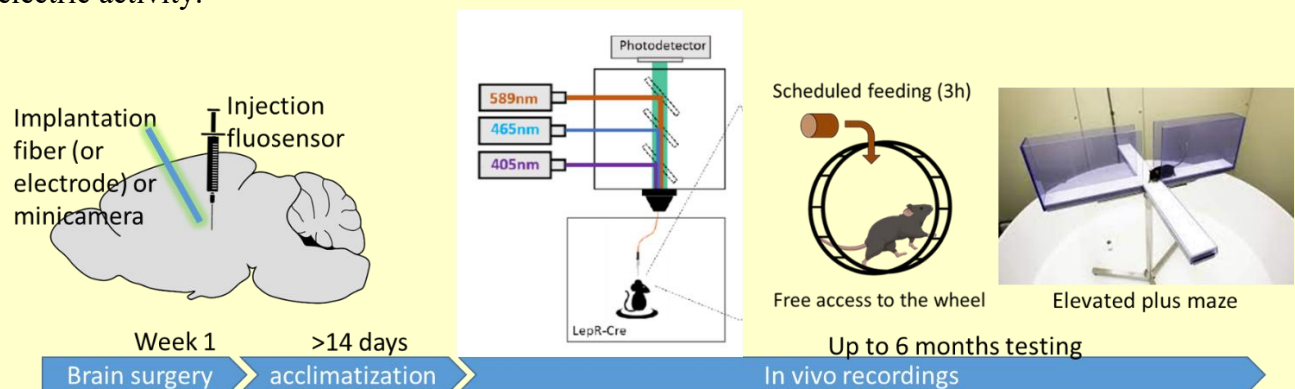


Figure 4: timeline of experiment where neurons are recorded from using calcium imaging or in vivo electrophysiology during behavior in the ABA(or CTA) model, elevated plus maze or other (an)orexigenic behaviors

In a typical experiment, we will record DA release in CeA and NAc using fiber photometry with sensors as DLight (AAV-hSyn-dLight1.2) in awake mice during exposure to the ABA model (as control, mice will be injected with AAV-hSyn-EGFP). For fiber photometry, AAV-hSyn-dLight1.2 will be injected in one side of the brain in the NAc and in the other side in the CeA and optic fibers will be implanted above the injection sites. 3 weeks later, the mice will be exposed to the ABA model and we will determine DA release before and at different phases of ABA exposure. Before exposure to ABA, the mice will have undergone the CTA protocol. The mice will have been exposed previously to small amounts of chocolate for familiarization. Next, for the induction of CTA, the mice get unlimited access to chocolate for 20 min, followed by an injection with LiCl to induce an avoidance to chocolate. The mice will then avoid chocolate. From day 3 of ABA exposure (when running has increased and mice lost weight), the mice will first be re-exposed for 15 min to the chocolate at dark onset after which they get access to chow. We will quantify the latency to approach and the amount of intake of chocolate. We will time lock DA release to approach to and intake of chocolate. We will also time lock initiation and termination of running and of chow intake to DA release and determine how activity of these neurons develops over days.

We will measure neuronal activity, by using one of the above described techniques (usually fiber photometry, but if higher resolution is required than in vivo electrophysiology or minilenses) for neuronal activity monitoring, during exposure to eating disorder models and exposure to tasks that capture aspects of eating disorder behaviors(Fig 4). In these tasks, rodents obtain (palatable) food items such as sucrose pellet or fluid. In some of the tasks animals will be punished by time-out periods and if necessary with a mild electric foot shock. In order to have more motivated animals we will mildly restrict them till their bodyweight reaches 90% of the ad-lib situation and maintain the animals on that weight (as long as needed). It takes a couple of weeks to train the animals on the task. Animals can be tested for a long

period with a max. of 200 days. Training will be done 3-5 times a week. Testing will be done max. 3 times a week. During test sessions we will measure neuronal and motivational behaviour

Q3. Manipulating neuronal activity

The purpose of these experiments is to determine whether activating or inhibiting activity of specific neuronal populations (or genes as in 3A) is sufficient and/or required for the expression of specific behaviors.

Using opto- and chemogenetics allows us to manipulate the activity of neurons during exposure to models of eating disorders.

Manipulation of the neuronal activity will be done with opto- and chemogenetics.

With **optogenetics** a opsin virus will be injected that will express light sensitive receptors on the neuronal membrane which will be activated/inhibited under the influence of laser- or ledlight. This gives us the opportunity to manipulate the neuronal activity on a precise temporal control of neuronal firing with light pulses.

With **chemogenetics** a DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) virus will be injected in specific brain regions selected from Q1 and Q2. This virus will express a G-coupled protein receptor on the membrane of the neurons which can be manipulated only with the designer drug (CNO-clozapineNoxide) which will be injected ip. This provides the ability to modulate neuronal activity for several hours with a single injection of CNO.

Besides these genetic approaches we can also manipulate neuronal activity by using ligands (such as agonists and antagonists as in 3C) that target genes (such as receptors) expressed in these cells. Another approach to manipulate activity is to remove targetable genes (3A), such as the leptin receptor, from specific neuronal populations.

3A. To delete targetable genes from candidate cells and determine its effect on expression of anorexic behaviors.

Primary outcome: an alteration of expression of anorexic behavior (such as feeding, locomotion and expression of anxious behavior)

A typical example is to delete leptin receptors from candidate cells and determine whether peripheral administration of leptin still reduces hyperactivity when these mice are exposed to the ABA model. We will delete leptin receptors from these cells using AAVcre (fig 5) in B6.129P2-Lep^{rtm1Rck}/J mice (these mice carry a floxed leptin receptor allele) or by crossing these mice with cre-driver mice to specifically delete the leptin receptor gene from genetically identified neurons (such as Ptx3 cre, CCK-cre and NPYcre mice) and determine whether peripheral administration of leptin still reduces hyperactivity when these mice are exposed to the ABA model. We expect this to identify leptin sensitive cells that are engaged in mediating the effect of leptin on hyperactivity. Similar approaches will be used for other targetable genes identified in Q1B. In case genetic mouse models do not exist that contain floxed alleles, we will use other strategies such as Crispr/Cas to manipulate gene expression of specific genes.

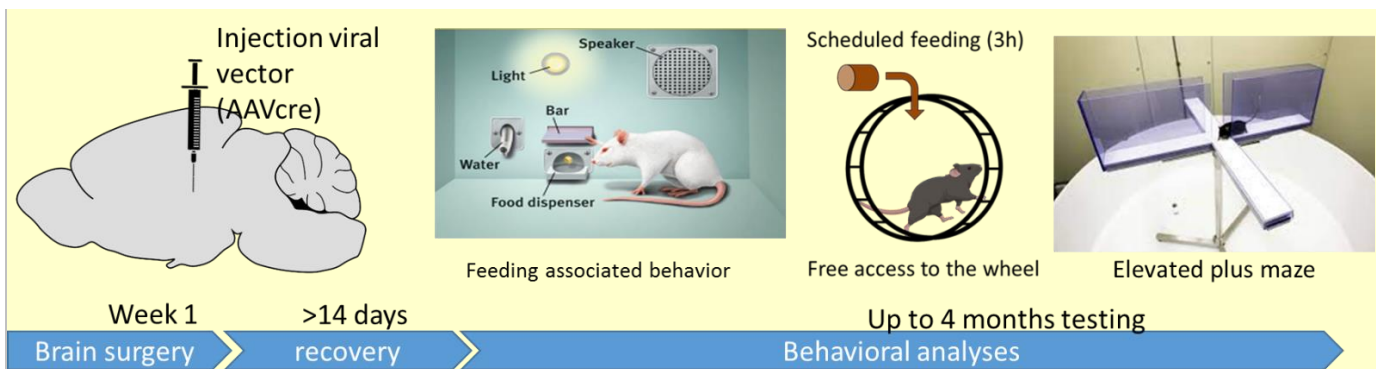


Figure 5: timeline of experiments where a specific gene is targeted using genetic approaches with the goal to unravel the role of the gene in anorexic behaviors

3B. Can anorectic behaviors be prevented by optogenetic or chemogenetic manipulation?

Primary outcome: the opto- or chemogenetic manipulation changes the expression of anorexic behaviors. For optogenetic manipulation the time scale impacting on these behaviors is seconds. For chemogenetic manipulation the time scale impacting on these behaviors ranges from 10 minutes up to 1 week.

We will address whether (long term) chemogenetic inhibition of different DA projection neurons modulates running and food anxiety in the CTA-ABA model and whether this manipulation impacts on body weight loss. We will use chemogenetics to control activity of these neurons (fig 6).

In a typical experiment, we will inject 6 week old PTX3Flip mice bilaterally with viral vectors that express hM4Di (the inhibitory receptor) or mCherry (control) dependent on flip and cre expression (an intersectional approach using pAAV-Ef1a-Con/Fon- hM4Di). Canine adenovirus expressing cre (Cav2cre) will be injected in NAc or CeA to deliver cre recombinase retrogradely to VTA neurons. To control activity in these neuronal projections, we will deliver a chemogenetic agonist (clozapine-N-oxide (CNO), compound 21 or the best available selective agonist for these receptors) during ABA exposure. We expect to reveal whether continuous inhibition of DA projection neurons counteracts the development of increased running, food anxiety and reduces body weight loss in the ABA model.



Figure 6a: timeline of typical chemogenetic experiment where the role of targeted neurons in anorexic behavior is tested

We will also explore the role of leptin-sensitive neurons in mediating behavior in ABA mice. As the lack of leptin is associated with increased (food) anxiety and running, we will determine to what extent LepR-expressing VTA neurons play a role in anxiety and running in the ABA model. In the VTA, LepRs are expressed on DA neurons ($VTA_{LepR/DA}$ which mainly project to CeA) and on GABA neurons ($VTA_{LepR/GABA}$ which inhibit VTA_{DA} neurons including those projecting to NAc). We will use Ptx3Flip:LepRcre mice that allow us to obtain chemogenetic control over $VTA_{LepR/DA}$ or $VTA_{LepR/GABA}$ using viral vectors that either inhibit or activate these neurons based on their expression of cre (to target

LepR neurons) with or without flipase (to target DA). For $VTA_{LepR/DA}$ we use pAAV-Ef1a-Con/Fon-hM4Di allowing expression of hM4Di only in cells expressing both flipase and cre. For $VTA_{LepR/GABA}$ we use pAAV-Ef1a-Con/Foff-hM3Dq which allows expression only in cells expressing cre but not flipase. We will expose mice to the CTA-ABA model (as in project Q1) and assess food anxiety, running and food intake. We expect inhibition of $VTA_{LepR/DA}$ neurons to reduce food anxiety in the ABA model. We will also discover how this impacts on running (as Stat3 removal increased running in sedentary male mice and feeding). We expect activation of $VTA_{LepR/GABA}$ neurons to reduce running and possibly reduce food anxiety and increase food intake.

To explore the requirement of DA release for expression of food anxiety and running we will optogenetically manipulate transmitter release from DA neurons, by recording DA release and optogenetic stimulation via the same fiber. In Ptx-cre mice, virus such as those expressing cre-dependent inhibitory or excitatory red light activated channels (Jaws (AAV-hSyn-Flex-Jaws), Chrimson (AAV-hSyn-DIO-ChrimsonR-mRuby2-ST) or control AAVs expressing cre-dependent red fluorophores) will be injected in the VTA and another virus expressing DLight will be injected in CeA and NAc. An optic fiber will be implanted above DLight injected regions. This allows us to record DA release with fiber photometry and simultaneously optogenetically control transmitter release from VTA DA neurons at projection sites (using Jaws to inhibit and Chrimson to stimulate) via the same optic fiber. Mice will be exposed to CTA and ABA and fiber photometry recordings will be performed. These experiments allow us to determine whether DA release is required (using Jaws inhibition) for expression of food anxiety and running and whether it enhances (using Chrimson stimulation) these behaviors.

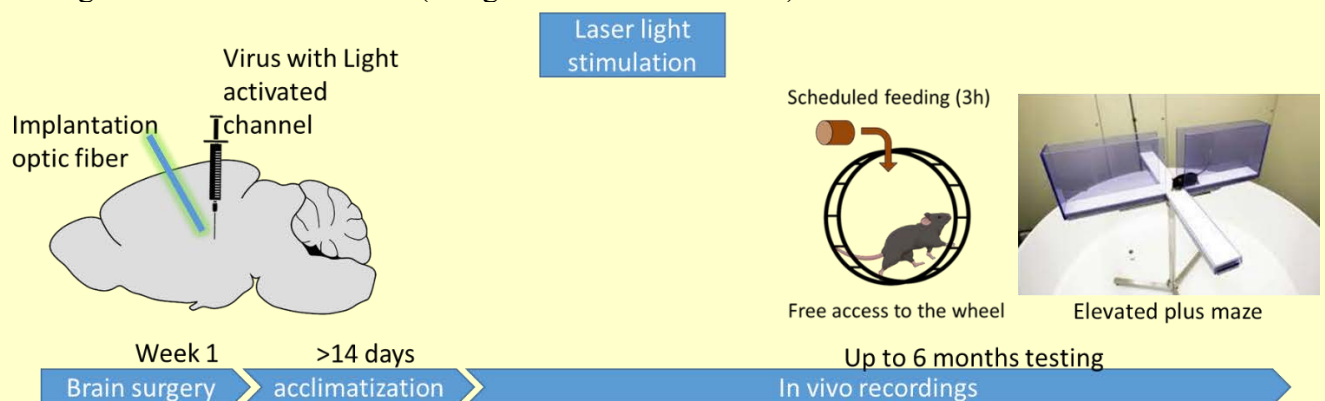


Fig 6b optogenetics: a mouse will be injected with a viral vector that delivers a light sensitive channel and implanted with an optic fiber via which laser light can enter the brain to activate or inhibit neurons. During performance of behavior laser light stimulation will be associated with entering or leaving the running wheel or disc, with access to food, or with entrance to the open arms of an elevated plus maze.

We will determine whether optogenetic stimulation affects initiation of running and latency to approach food in the CTA test by repeating 2 min periods of red laser on and red laser off. We expect that inhibition of the $VTA_{DA} \rightarrow CeA$ projection reduces expression of food anxiety and inhibition of the $VTA_{DA} \rightarrow NAc$ projection to reduce running. Activation of these projection would increase these behaviors. These experiments will reveal how DA release relates to food anxiety and running in the ABA model, and test the requirement of different DA projection neurons for these behaviors. Finally we use mice (with DLight in Nacc and CeA) inject leptin 4 hrs before dark onset and determine how it impacts on DA release and on behavior. Similar approaches will be followed to assess the role of other specific populations of neurons such as those that express leptin receptor and neurons identified under Q2. When we need to determine the effect of manipulation of ensemble activity on regulation of body temperature (leptin for instance is known to increase body temperature under food restriction conditions) an telemetric probe will be placed intra-abdominally.

3C: validating drug targets.

Primary outcome: the effect of drug administration on the expression of anorexic behavior

Besides drug targets for eating disorders that we identified previously (such as leptin and ghrelin receptors), in the course of the project (based on results from Q1B) we expect to identify new targetable genes (such as receptors and enzymes) that we can target with gene therapy approaches or ligands (including drugs).

We will treat rodents with ligands like ghrelin and leptin and drugs that mimic or block specific targetable proteins (as receptors) and record neuronal activity (using fiber photometry and other technologies as minilenses and in vivo electrophysiology) from specific neurons of brain regions like hypothalamus and mesolimbic system that we identified as candidate populations in earlier projects and in Q1 and Q2) and relate it to performance in eating disorder models. We will primarily look into the neuronal activity changes. Secondary we will measure the effect of ligands on food-related decision making, anxiety, exploratory behavior and food intake. If necessary we will take and analyse blood (hormone levels). This is for instance the case we aim to determine whether blood levels of leptin and other proteins affecting its action are predictive of leptin's efficacy to reduce running wheel activity in the ABA model. We will then take a blood sample before (metre)leptin injection and at the end of the administration period (to assess the level we reach with exogenous administrations). These parameters will represent the influence of ligands, like leptin and ghrelin, on the neuronal activity changes in brain areas involved in eating disorder models.

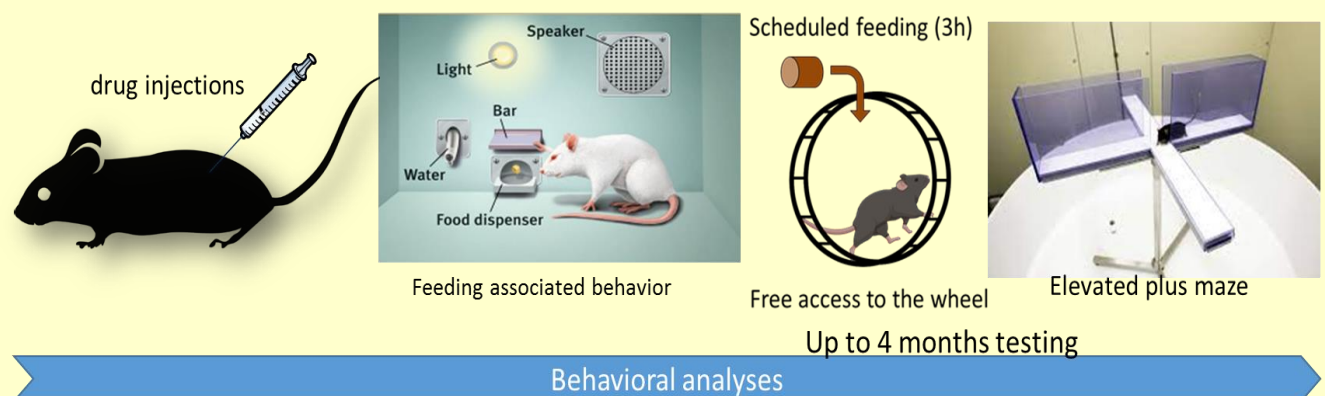


Figure 6: timeline of evaluating the efficacy of drugs to modulate anorexic behaviors

Depending on the kinetics of the drug (half life, uptake by the body, distribution and metabolites) it will be delivered via sc, ip, iv, icv, minipumps or local brain area injection. In case of icv or local brain injection the animals will have a brain surgery to implant the cannulas, this will be done in the same surgery as virus injection. During the experiment the animals will get up to 2 injections/day. For some hormones (like leptin) and neuronal antagonists (like, exendin-4) an animal in a hungry state is needed to measure changes. Animals will be food restricted such that they do not lose more than 10% of body weight. Food will be provided during the night when animals naturally take most meals. Between food restriction periods, animals will have at least 24 hours to recover, or till they are back to previous BW. When we need to determine the effect of manipulation of ensemble activity on regulation of body temperature (leptin for instance is known to increase body temperature under food restriction conditions) a telemetric probe will be placed intra-abdominally.

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

Eating disorder models:

Activity-based anorexia (ABA) (in all experiments Q1, Q2, Q3)

This is a well established model for aspects of anorexia nervosa symptomatology (hyperactivity, body weight loss, anxiety and metabolic and hormonal changes).

Rats or mice are exposed to cages with running wheels or discs. Adaptation phase (10 days): the animals are placed in the running wheel cages. We call this the adaptation phase of the experiment. Here the animals will become familiar with the running wheel. They are given 10 days to do this. Restriction phase (up to 7 days): the rats (1-2 hrs) or mice (2-3 hrs) will have access to food after the start of the dark phase from day 10 of the running-in phase, the activity based anorexia (ABA)/restriction phase begins. As deviation we will give animals a fixed amount of food such that their weight remains above the HEP. This will be done in particular after re-exposure to the ABA model (which we will do in for instance TRAP2 mice where we first TRAP cells such that we can genetically access them and determine the role of these cells upon re-exposure) or if we need to prolong the restriction phase for longer than one week (in studies that determine relapse). The animals are weighed daily. Every day at the beginning of the dark phase they have access to food. We may provide food at another time point of the day if experimental conditions require so (for instance if food anticipatory running activity needs to be dissociated from anticipating the dark phase when we usually give food).

Killing: In most experiments after 7 days in the restriction phase, the animals are killed, blood is collected and the fatty tissue is dissected. In some experiments we will re-expose animals to ABA or another paradigm (see below).

Intervention:

In some animals viruses are injected before exposure to the model (for mapping/tracing and for opto- or chemogenetics).

Another intervention in this model is the administration of various drugs that we expect to modulate anorexic behaviors (including leptin and other feeding hormones). These will be administered (such as by injection up to twice a day) for a maximum of 7 days. This can be done by placing a mini pump s.c. or icv (intra cerebroventricular) just before the ABA phase or injections (icv, s.c., i.p.) or nasal administration during the ABA phase. The dosages are based on findings from the literature and adapted to the routes of administration. The routes of administration are based on properties of the substance (does it cross the blood brain barrier, has it previously been administered orally and then enters the bloodstream (bioavailability) etc), the possibility of using a mini pump in case of chronic therapy. In case we need to administer directly into the brain, the animals will be supplied with cannulas before exposure to ABA. In some experiments the animals receive stereotactic injections with tracers or viruses for mapping purposes.

Conditioned taste avoidance (CTA) (in Q1, Q2 and Q3)

Experimental design:

- Mice are habituated to shifted day-night cycle. --> 2 weeks
- To get the mice motivated in the task they will be put on a mild food restriction schedule (90% of original BW). --> total duration of the experiment is 12 weeks
- Mice are habituated to an operant box where they receive a reward (sucrose solution). --> 1-2 weeks
- Once they learned the task they will receive a new reward (e.g. chocolate milk). After consumption of this new reward the mice receive a Lithium Chloride injection (the mice may receive a second LiCl booster in case CTA does not develop or extinguishes; if LiCl injections interfere with the experimental setup we will use another aversive stimulus and we will use a single mild electric footshock which is delivered immediately after chocolate intake). Read-out in the task is: Extinction of licking behavior, volume of chocolate milk consumed, and latency to lick. The extinction of licking will show the successful creation of an aversion to the chocolate. Mice will be re-exposed for 10 minutes daily to the chocolate milk until they consumed it on two consecutive days (volume consumed >500ul, latency to approach <10 minutes), which will mark the extinction of the aversion.

In case CTA does not develop (after 2 LiCl injections), the animals are removed from the experiment (HEP).

- The latency to approach of the chocolate milk during the first exposure will also serve as a measurement for food neophobia.

- After the CTA, anxiety will be tested in the mice with an anxiety task (e.g. elevated plus maze or open field).

Total duration of the experiment: up to 12 weeks

ABA/CTA combination (in Q1, Q2 and Q3)

In some experiments we will first expose animals to CTA followed by ABA. During the ABA restriction phase we will re-expose animals to the food that was previously associated with the aversive stimulus. Even at the end of the restriction phase of the ABA model, in case animals were exposed to CTA before ABA, despite being in negative energy balance the animals avoid taking chocolate.

The purpose of these procedures which will be used to address Q1 is mapping neural structures involved in eating disorders. These procedures will also be used further up to address whether for instance drugs, gene or ensemble manipulation influences the survival of animals exposed to the ABA model, or to assess food anxiety.

Exploration of aspects of behaviors relevant to eating disorders

The main outcome parameters we will determine are hyperactivity in running wheels, food anxiety (induced by the CTA model) and body weight loss and food intake in the ABA model. To determine the specificity of the role of neuronal ensembles and targetable genes in these main parameters we have several control procedures. We will therefore address whether locomotor activity, body weight loss and food intake (is it motivation to obtain food or sensing the palatability which we can determine with conditioned place preference and operant conditioning) are also affected outside the context of the ABA model or caused by deficits in motor coordination (rotarod). We will also address whether anxiety is specific for food in the CTA model or also for other types of anxiety (such as expressed in the elevated plus maze, open field or approach to any novel food).

Elevated plus maze (EPM) (Q2B and Q3)

The elevated plus maze is a widely used behavioral assay for rodents and it has been validated to assess the anti-anxiety effects of pharmacological agents and steroid hormones, and to define brain regions and mechanisms underlying anxiety-related behavior. Briefly, rats or mice are placed at the junction of the four arms of the maze, facing an open arm, and entries/duration in each arm are recorded by a video-tracking system and observer simultaneously for 5 min. Other ethological parameters (i.e., rears, head dips and stretched-attend postures) are also observed. An increase in open arm activity (duration and/or entries) reflects anti-anxiety behavior. Animals are placed on elevated platform for 10 min which is partly protected with side walls.

Duration: in most cases one time exposure, in rare cases 3 times

Open Field (Q2B and Q3)

Animals are placed in an enlightened area for up to 15 min. In some experiments we will place an object, a food item or another animal in the arena. Behavior is recorded with a video camera. Total distance moved is recorded as well as time spent in center and wall zone. If an object is positioned in the field, latency to approach and time exploring is recorded.

The EPM and open field will be used to determine whether anxiety that is induced or suppressed is specific to food.

Duration: in most cases one time exposure, in rare cases 3 times

Assessment of food intake (Q2b and Q3)

To increase behavioral performance animals are food restricted such that that body weight drops to 90-95%. The animals get access to one of more food items and we measure latency to approach, speed and total intake of food. During food intake experiments (exposure to specific diets, food intake after hormone/drug treatment) animals will be housed individually. As is known, male mice are very territorial and regrouping after individual housing will no longer be possible.

Duration: up to 12 weeks

Rotarod (Q3)

Animals will be placed on a rotarod for 5 times with different rotorspeeds. The time is recorded how long the animal stays on the rod before falling off. This serves to determine whether motor coordination is intact (as control for effects on running)

Duration: in most cases one time exposure, in rare cases 3 times

Conditioned place preference (Q2B and Q3)

Two compartments are connected with a compartment in between. Initially the preference for the compartments is tested. In one compartment animals are injected or optogenetically stimulated for 3 times, in the other compartment the animals get control exposure for 3 times. On the experimental day animals display their preference to be in one of the two compartments

Duration of experiment: 2 weeks

Operant conditioning (including progressive ratio) (Q2B and Q3)

Animals will be exposed to cages that are provided with a food receptacle or drinking spout, two or more nosepoke holes or levers and are on a grid that in some cases allow to deliver mild electric foot shocks (as in some experiments for CTA). In a typical experiment, animals learn that a light or sound stimulus predicts that nose poking or lever pressing will (eventually) lead to a food reward or punishment.

This procedure allows to evaluate food seeking and motivation to work for food

Duration: up to 12 weeks

Surgical procedures: we will adhere to the best codes of practice related to perioperative care (<https://english.ncadierproevenbeleid.nl/best-practices/documents/publications/23/20/21/code-of-practice-perioperative-care>)

Stereotaxic surgery (Q1A to determine connectivity; Q2 and Q3)

With stereotaxic surgery we are able to accurately target structures within the brain with the use of a stereotaxic brain atlas. With this surgery we can do viral injections, place implants or place cannulas.

- a) Viral injections in different brain areas to target neurons and change the behavior of the animal to gain insight about neuronal pathways as previous described in “**Experimental approach and primary outcome parameters**”.
- b) Placement of optic fiber or other implant (minicamera or optrode) to measure the neuronal activity of different brain areas *in vivo*.
- c) Placement of brain cannula for local administration of drug

After placement of a head-cap (brain implant), animals will be housed individually (when possible with remaining visual, auditory and olfactory contact by using a cage divider), to avoid damage of the implant. Surgeries are done under anesthesia and analgesia will be administered on the day and first days after surgery and the animals will be monitored these days

Placement of a telemetric probe (Q3B and Q3C)

An intra-abdomal telemetric probe will be placed under anesthesia. Where possible this will be done during brain surgery such that the animals are only anesthetized once.

Blood sampling Q3A and Q3C

To measure different hormones such as leptin we need to withdraw the blood (up to 100 ul) of the animal twice, before and at the end of drug administration. There are multiple techniques we could use such as; via a tail cut, via a permanent intravenous cannula or via Vena saphena. We will follow the descriptions of good practice from DIEHL et al, 2001.

IP/SC/IV injections (Q3A and Q3C)

As previously described there are multiple interventions with drugs such as CNO and anesthetics. There are various administration techniques we could use such as; *intraperitoneal injection (IP)*, *subcutaneous injection (SC)* and *intravenous injection (IV)*. We will follow the good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes from DIEHL et al 2001.

Killing of animals (Q1, Q2 and Q3)

Animals will be killed by cervical dislocation and decapitated for Q1B and Q2A as we need fresh brain tissue

Animals will be killed by a lethal injection for procedures Q1A, Q2B and Q3 as we need to examine the brains microscopically

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

The number of animals is calculated by the effect size, standard deviation of the primary readout parameter, alpha and power. The mentioned group sizes are the maximum number of animals. For each experiment the sample size will be calculated with the help of a biostatistician and checked for each work protocol communicated with the animal welfare body (IvD). To optimize animal procedures (behavioural tasks, injection brain areas, virus concentrations and dosages of pharmaca) we will need extra rats and mice for these pilots. For optimization of coordinates of brain areas and virus concentration we will inject a virus and kill the animals after 3-5 weeks and slice brains for immunohistochemistry. For optimization of behavioural tasks and dosages of pharmaca we can use photometry animals that don't give a neuronal signal after repeatedly measuring. These animals reach the HEP of the specific research question, but can be used for this.

1A mapping studies

We have 3 models (ABA, CTA, ABA+CTA) * 4 groups (experimental group, food restricted group no wheel, wheel fed ad lib, ad lib sedentary group) * 2 treatment conditions (leptin or vehicle) * 24 animals per group = **576 mice**. Due to reaching HEP before end of the experiment we expect 5% drop out, thus we need 605 mice

As this is a mapping study, based on our experience these numbers are required to fully map brain expression

Tracing studies: 2 models (only ABA and ABA-CTA)*4 injection sites*8 animals per group= 64 mice. Due to non recovery after surgery we expect 10% dropout, thus we need 70 mice.

1B Transcriptome studies

We have 3 models (ABA, CTA, ABA+CTA) * 4 groups (experimental group, food restricted group no wheel, wheel fed ad lib, ad lib sedentary) * 2 treatment conditions (control and re-exposure) * 24 animals per group = **576 mice**. Due to reaching HEP before end of the experiment we expect 5% drop out, thus we need 605 mice

For transcriptomic studies, based on our experience these numbers are required to reliably determine cellular gene expression

2A Slice electrophysiology

5 pathways * 3 cell types/pathway * 4 conditions (ABA (or ABA+CTA), food restriction without running wheel, running wheel no food restriction and ad lib sedentary) * 20 animals / condition = **1200 mice**. Due to reaching HEP before end of the experiment and non recovery from surgery, we expect 10% drop out, thus we need 1320 mice

2B in vivo recordings

5 pathways * 3 cell types/pathway * 4 conditions (ABA (or ABA+CTA), food restriction without running wheel, running wheel no food restriction and ad lib sedentary) * 10 animals / condition = **600 mice**. Due to reaching HEP before end of the experiment and non recovery from surgery we expect 10% drop out, thus we need 660 mice

3A manipulating drug target genes

5 target genes * 4 conditions (ABA (or ABA+CTA), food restriction without running wheel, running wheel no food restriction and ad lib sedentary) * 10 animals / condition = **200 mice**. Due to reaching HEP before end of the experiment and non recovery from surgery we expect 10% drop out, thus we need 220 mice

3B opto/chemogenetics

Chemogenetics in the ABA model in mice. We have 3 dietary manipulations (ABA, FR, RW) * 18 brain regions * 15 animal per group = 810 mice. We expect a drop-out of 10% (caused by reaching HEP), in total **891 mice** are needed.

Chemogenetics in the ABA model in rats. We have 3 dietary manipulations (ABA, FR, RW) * 4 brain regions * 15 animal per group = 180 rats. We expect a drop-out of 10% (caused by reaching HEP), in total **198 rats** are needed.

Optogenetics in the ABA model in mice. We have 3 dietary manipulations (ABA, FRr, RWt) * 18 brain regions * 15 animal per group = 810 mice. We expect a drop-out of 10% (caused by reaching HEP), in total **891 mice** are needed.

3C drug treatment

Drug treatment in the ABA model in rats. We have 3 groups (ABA, food restricted no RW and RW fed ad lib) * 6 types of drug * 3 doses * 2 groups (control vs. drug treated) * 15 animal per group = 1620 rats. We expect a drop-out of 10% (caused by reaching HEP), in total **1782 rats** are needed.

Drug treatment in the ABA model in mice. We have 3 models (ABA, food restricted and no RW and RW fed ad lib)* 2 types of drug * 3 doses * 2 groups (control vs. drug treated) * 15 animals per group = 540 mice. We expect a drop-out of 10% (caused by reaching HEP), in total **594 mice** are needed.

In total 1980rats and 5856 mice will be used.

To minimize the number of animals used in these experiments, each animal will be his / her own control as much as possible. Where possible we will use both gender.

procedure	mice	mice	mice	rat	rat	rat	
	mild	moderate	severe	mild	moderate	severe	
1A	450	155+70					
1B	450	155					
2A	1000	320					
2B	380	260	20				
3A	150	70					
3B	1280	450	52	138	60		
3C	394	200		1188	594		
Total	4104	1680	72	1326	654		

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
Q1A.	Mus Musculus	registered breeding	young adult	676	Both	yes	C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells.
Q1B	Mus Musculus	registered breeding	Young adult	606	Both	Yes	C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells.
Q2A	Mus Musculus	registered breeding	young adult	1320	Both	Yes	C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells
Q2B	Mus Musculus	registered breeding	young adult	100 560	Both	1. No 2. Yes	C57B6 C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells
Q3A	Mus Musculus	registered breeding	young adult	220	Both	yes	C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or

Q3B	1. Mus musculus	registered breeding	young adult	200 1582	Both	1. No 2. Yes	fluorophore expression in specific groups of cells C57B6 C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells
	2. Rattus Norvegicus	registered breeding	young adult	50 148	Both	1. No 2. Yes	wild type (Long Evans) TH: Cre (Long evans)
Q3C	1. Mus musculus	registered breeding	young adult	94 500	Both	1. No 2. Yes	C57B6 C57B6-based, but with various (harmless) recombinase or fluorophore expression in specific groups of cells
	2. Rattus Norvegicus	registered breeding	young adult	1782	Both	no	Wild type (Long evans or Wistar)

Provide justifications for these choices

Species	Rats and mice will both be used. Mice are used since we need to use genetically modified animals to reach enough specificity to address our research questions. We use rats in case we need to take blood samples as the amount we need would give too much burden in mice. We will use genetically modified rats (TH-Cre) as in case we also need to take blood samples in genetically modified animals.
Origin	Registered breeders and/or breeding within registered own facility). Click or tap here to enter text.
Life stages	As young rodents are more susceptible to develop anorexic behavior in the ABA model, we will preferable use rodents of 6 weeks of age.
Number	See under statistical paragraph above
Gender	AN occurs 10x more in females than in males and female rodents are more susceptible to the ABA model. As we breed our genetically modified animals ourselves, we will use males where possible (such as for determining brain coordinates for injections) to reduce breeding surplus. We expect to use 3x more females than males.
Genetic alterations	Genetically modified animals will in general carry the recombinase under control of a specific promoter (such as TRAP2, Ptx3cre/flip, VGATcre/flip, LepRcre, CCKcre, VGLUTcre, TH-cre etc) or express a fluorescent protein under a specific promoter (Ptx3GFP) or carry a gene that is expressed when a recombinase is activated (such as TdTomato, LepRfloxed etc.). In case new mouse lines are generated for which we cannot exclude discomfort, these will be generated under another license. We will also use TH-cre rats.

Strain Transgenic mice are typically on a C57B6 background. TH cre rats are on a Long Evans background

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Animals are housed individually when they have access to a running wheel, when they have a brain cannula and when we measure food intake. Animals with fiber optics implanted will be socially housed as much as possible. We will house animals solitary for up to 12 weeks. When possible we will house them with other animals separated by a semitransparent wall.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

There will be very brief discomfort due to pain due to cervical dislocation and decapitation. These procedures will only be performed by experienced biotechnicians and scientists. As the animals are handled by the experimenters the stress during this procedure is very low and the procedure is very fast (less than one second). As the discomfort is so short, analgesia 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.

For the pain experienced during and after surgery we use pre-, peri- and postoperative anaesthesia and analgesia.

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

There will be discomfort during the ABA model due to body weight loss and lower body temperature

There will be discomfort due to not being able to eat when hungry resulting in body weight loss and due to LiCl injections which induce nausea.

There will be novelty stress upon first exposure to behavioral tests.

In case we need to house animals individually, there is stress from lacking social partners

Administration of drugs gives some discomfort

The single exposure to a mild footshock gives discomfort

Animals for optogenetics and fiber photometry will be attached with a optic fiber which limits their movement

Explain why these effects may emerge.

Discomfort during the ABA model is due to a negative energy balance and feelings of hunger and to not being able to eat

There will be discomfort due to LiCl injections which induce nausea

Any novel environment induces a conflict between curiosity and anxiety to encounter a negative experience

Solitary housing is a burden to rodents that naturally display a preference for social partners

Drug administration via injection gives brief pain of needle penetrating the skin

Optic fibers and any device on the head of rodents limits movement

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

Animals are frequently checked for abrupt changes in body weight or food intake, which permits rapid identification of problems that would be grounds for euthanasia. All animals that undergo a surgery will get adequate anaesthesia and analgesia. Animals will be handled frequently so that they are used to the experimenters and environments, to injections and to attachment of optic fiber cables to their heads. If upon exposure to the ABA model animals display starvation we will either provide them with more food or killed if the HEP is achieved.

E. 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 F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

For surgeries; When an animal is losing more than 15% in the first 2 days and their general health parameters are reduced and will not eat from the wet chow that will be given to the animal. When in total 20% bodyweight loss occurs.

For behavioural experiments; No HEP is expected. If we discover a sick animal we use the criteria as from after surgery.

For fiber photometry; when we can't measure neuronal activity for 2 weeks.

For the CTA model: if the mice do not develop CTA after 2 LiCl injection, the HEP will be reached.

For ABA model: When animals have lost 20% of their BW after the food intake period, they will be put on ad libitum food or euthanized. Hypothermia: In mice with hypothermia (based on tangible cold feet), a heat mat is placed under the cage for 2 hours and the animal is checked after this period. If necessary, this period is extended by another 2 hours. After 3 attempts, the animal is put on ad libitum food or euthanized. Food intake: When animals eat less than 1.5 grams and have lost 20% of their body weight, a small piece of food is given to the mice up to a maximum of 2.5 grams in total.

Rats exposed to the ABA model reach the HEP when 20% of weight (measured after food intake period) is lost and they eat less than 4 grams of chow. In case the rats have a probe that measures temperature the HEP will be reached when body temperature gets lower than 34 C.

Indicate the likely incidence.

Surgery; 5%

Behavioural experiments; 1%

ABA model: up to 20% reached HEP in the experimental group (not in control groups)

Fiber photometry; up to 20% (including 5% of surgery HEPs); due to gliosis around the optic fiber tip and poor expression of fluorophore there is a relatively high number of dropouts (animals that have to be killed because there is no signal detected) while we already optimized procedures as best as we can.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The percentages of the discomfort for each category are as follows:

Mice

Mild 70%

Moderate 29%

Severe 1%

Rats

Mild 67%

Moderate 33%
Severe 0%

<u>Animal procedure</u>	<u>Maximum severity</u>	<u>Remarks</u>
<u>Activity-based anorexia (ABA)</u>	Moderate up to 10% only in the experimental ABA group	Due to loss of bodyweight and hypothermia. We have a strict HEP to prevent the severity level 'severe'
<u>Conditioned taste avoidance (CTA)</u>	Mild less than 5%	
<u>ABA/CTA combination</u>	Moderate up to 10% only in the experimental ABA group	Due to loss of bodyweight and hypothermia. We have a strict HEP to prevent the severity level 'severe'
<u>Elevated plus maze (EPM)</u>	Mild	
<u>Open Field</u>	Mild	
<u>Assessment of food intake</u>	Mild	
<u>Rotarod</u>	Mild	
<u>Conditioned place preference</u>	Mild	
<u>Operant conditioning (including progressive ratio)</u>	Mild	
<u>Stereotaxic surgery</u>	Moderate Severe up to 3% in mice that wake up after surgery but are found dead later on	The animal will experience discomfort of the surgery but the welfare is being checked and there is a HEP to prevent the severity level 'severe'. We are further determining HEPs around brain surgery in order to avoid dead after initial recovery. We are currently exploring which factors influence finding mice dead in the cage after initial recovery from surgery which include: source, expiry dates and type of anaesthesia; length of surgical procedure, brain regions that are targeted.
<u>Placement of minipump or brain cannula for local administration of drug</u>	Moderate Severe up to 3% in mice that wake up after surgery but are found dead later on	The animal will experience discomfort of the surgery but the welfare is being checked and there is a HEP to prevent the severity level 'severe'. We are further determining HEPs

		around brain surgery in order to avoid dead after initial recovery. We are currently exploring which factors influence finding mice dead in the cage after initial recovery from surgery which include: source, expiry dates and type of anaesthesia; length of surgical procedure, brain regions that are targeted.
<u>Blood sampling</u>	Mild	
<u>IP/SC/IV injections</u>	Mild	
<u>killing</u>	Mild	
<u>Mild foot shocks</u>	mild	
<u>Individual (solitary) housing</u>	mild	

G. 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	For all experiments the primary outcomes require an intact animal. We are in the process of obtaining iPSCs from eating disorder patients with the aim to generate cell types that we study in vivo. However before we can work with these cells, we need to know which cell types we have to focus on and for this use animal experiments. Once successful we need parallel studies to validate that differentiated iPSCs indeed have similar properties that we can study in a more physiological context. We are also involved in clinical studies with eating disorder patients that are complementary to animal experiments. However the clinical studies do not allow us to address the questions we have on cellular and ensemble activity
Reduction	Were possible we will use males and females for our experiments. For the fiber photometry, opto- and chemogenetics we will obtain multiple recordings from the same animals, which greatly reduces the amount of animals required. In most cases each animal serves as its own control. Where possible we will use one control group for multiple interventions and use historical control data to reduce the sample size of the control groups. To reduce breeding surplus we will ask advise from the breeding coordinator.
Refinement	We use a variety of techniques that are well-established within the laboratory to provide a high degree of specificity in the neural circuits examined. When individual housing is needed visual, auditory and olfactory contact will be maintained by using semitransparent cage dividers. We increase the ambient temperature when animals are exposed to ABA as this saves energy and body weight. Our animal experimenters are trained in non-invasive handling procedures. Following surgery the animals will be provided with warmth using a pad and receive post-surgery care (such as painkillers). We will use tube handling to move animals. Animals with optic fibers will be trained without fiber cables attached.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

Click or tap here to enter text.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

Where possible we will re-use animals. This is for instance possible if we want to perform pilot studies for determining brain coordinates for targeting a brain region or in case animals are implanted with optic fibers and that can be used to address other questions in our own research or those of others. Once trained our animals are used to be handled and in general the burden to the animals is very mild. We believe it is therefore better to use these animals longer than to use new animals, because the first exposures of animals to experimental conditions and handling are always more stressful to the animals. Of course we will carefully monitor cumulative burden and communicate this with the animal welfare body.

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.

Click or tap here to enter text.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

N.A.

J. 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 K.

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.

Click or tap here to enter text.

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

Depending on cumulative burden or the need to perform post-mortem analysis (such as verification of targeting the right brain region) we will kill the animals or make them available for re-use or adoption (only in case of socially housed wild type animals).

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

In several experiments we need to collect tissues from the animal to use for further analysis

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.

To perform single-cell RNA sequencing with brain cells, we must perform cervical dislocation and decapitation

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

we want to do immunohistochemistry with brain slices, therefore we need to perform a perfusion with PFA with prior sedation and an overdose of anesthetics

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202417980
2. Titel van het project : Neurobiology of anorexia nervosa
3. Titel van de NTS : De neurobiologie van anorexia nervosa

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 28-03-2024
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 03-04-2024
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot: 10-04-2024 / 18-04-2024
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 15-05-2024

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 03-04-2024
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 6
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de strategie, de keuze voor de modellen en voor leptine als focus van onderzoek en over het aantal dieren. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 10-04-2024

- Datum antwoord: 18-04-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

Het onderzoek is wetenschappelijk zeer interessant. De DEC vindt het wel vrij uitgebreid beschreven. Kunt u de inleiding verduidelijken, bijvoorbeeld door het in te korten? Dit helpt de DEC om een zorgvuldige ethische afweging te kunnen maken.

Ik heb een inleiding over de rationale van de aanpak toegevoegd. Ik hecht eraan zo volledig mogelijk te blijven als het gaat om de wetenschappelijke onderbouwing van het project. Aan het eind van ieder stuk staat een conclusie ("Taken together..."), op grond waarvan ik hoop dat het helpt een ethische afweging te kunnen maken. Ik heb ook een figuur toegevoegd (fig 2) die de key findings laat zien waarop de rationale gebaseerd is.

Rationale of the direction of proposed research

Previous work has shown the relevance or (low)leptin and alterations in the dopamine system in driving anorexic behaviors in the ABA model (figure 2). This provides the basis to further unravel how leptin and the dopamine system play a role in the ABA model. Besides this approach, we now also have a second (unbiased) approach (using TRAP2 mice) to identify neuronal ensembles. Together, these approaches allow us to unravel the neurocircuitry that underlie anorexic behaviors such as hyperactivity and anxiety in the ABA and CTA models. Besides the ABA model, we introduced the CTA model in order to focus also on food anxiety, which is so relevant in the perspective of anorexia nervosa.

Wat heeft u eerder onderzocht op dit gebied, u vertelde al over uw onderzoek t.a.v. microbiom? Hoe sluiten de resultaten en bevindingen van eerder onderzoek (m.n. met het ABA-model) aan op dit onderzoek en wat wilt u bereiken? Kunt u ook in het project toelichten waarom u nu kiest voor leptine?

Om dit te beantwoorden heb ik niet alleen de rationale en figuur 1 toegevoegd, maar ook: In our earlier work, we also explored the role of microbiome in the development of anorexic behaviors. Although depletion of the microbiome (by antibiotics) made animals more susceptible to lose weight in the ABA model, transplantation of stool from patients with anorexia nervosa compared to controls showed no difference in outcome of the ABA model. We therefore discontinued this work.

I also focused my research more to mechanisms underlying anorexia nervosa.

Ik heb ook de conclusie aangepast in het stuk dat gaat over de rol van leptine:

Taken together, unravelling how leptin and dopamine neural circuitry impact on anorexic behaviors, are timely and important issues as these are likely relevant to the development of anorexia nervosa

Er worden in de muis diverse modellen (ABA, CTA) ingezet en gestapeld. Daarnaast gaat u ratten gebruiken voor een deel van uw onderzoek. Kunt u verduidelijken wanneer u ratten gaat inzetten? Hoe wordt gecontroleerd of het in de mens ook nog speelt? Tussen mens en knaagdieren zijn veel verschillen. In samenhang daarmee vraagt de DEC zich af welke vormen van anorexia nervosa er in de humane populatie voorkomen, die een behandeling noodzakelijk maken en hoe transleerbaar de (combinatie van) modellen hiervoor is/zijn?

Ratten worden ingezet als de grootte van het dier van belang is voor het behalen van resultaten. Dat is het geval als we bloed willen afnemen zoals in experimenten waarbij we leptine toedienen en het plasmanivo voor en na toediening van leptine willen bepalen. Het is ook het geval als we verschillende populaties van dopamine neuronen (zoals die in VTA versus SN) chemogenetisch willen manipuleren, omdat dan injecties met virussen preciezer deze kernen kunnen raken (omdat ze bij de muis te dicht bij elkaar liggen).

In de bijlage hebben we hiertoe toegevoegd:

In case we need to target brain nuclei that are close together such as VTA and SN, we will use TH-cre rats in which viral injections with chemogenetic tools remain more restricted to one nucleus rather than spreading to nearby nuclei (as happens in mice).

Er bestaan twee typen anorexia nervosa bij de mens: het restrictieve type en het binge purging type, maar in de praktijk is die scheidlijn niet strict en komen er periodes voor dat dezelfde patient overgaat van het ene in het andere type. Het ABA model bootst met name het restrictieve type na. Het restrictieve type is de veel voorkomende en ernstigste vorm van anorexia nervosa waar veel mortaliteit voorkomt en waarvoor het vinden van betere behandelingen urgent is.

Ik heb toegevoegd:

There are two types of anorexia nervosa in humans: the restrictive type and the binge purging type, but in practice the dividing line is not strict and there are periods when the same patient switches from one type to the other. The animal model we use specifically mimics the restrictive type. The restrictive type is the common and most severe form of anorexia nervosa where mortality is high and for which finding better treatments is urgent.

Van het ABA model is bekend dat bevindingen goed transleren (zie voorstel waar ik o.a. olanzapine en leptine noem). We denken dat de combinatie van ABA met CTA goed transleert, maar omdat wij de eersten zijn die dit op deze manier onderzoeken weten we dat nog niet. Onze meest recente bevindingen met de combinatie van het ABA en CTA model laat zien dat dieren die naast het CTA model ook het ABA model ondergaan, veel langer het "verboden" voedsel mijden. Door blootstelling aan het ABA model, precipiteren negatieve gedachtes over voedsel (geïnduceerd door CTA) blijkbaar veel sterker. Dit mechanisme zou een rol kunnen spelen bij veelvoorkomend terugval na aanvankelijk herstel van anorexia nervosa.

Ik heb een figuur (fig 1) toegevoegd en tekst:

Our most recent findings with the combination of the ABA and CTA model show that animals that undergo the ABA model in addition to the CTA model avoid the "forbidden" food for much longer. By exposure to the ABA model, negative thoughts about food (induced by CTA) apparently precipitate much more strongly. This mechanism may play a role in common relapses after initial recovery from anorexia nervosa

3.2 Doel

In de doelstellingen lijkt het voor de DEC alsof u meer dan alleen de mechanismen waar leptine op aangrijpt, wilt onderzoeken. U heeft aangegeven te willen begrijpen wat de neurale circuits zijn die onderliggend zijn aan hyperactiviteit en angst. Hiervoor heeft u twee belangrijke invalshoeken genoemd: leptine en de genetisch gemodificeerde muis die helpt

om vast te stellen welke hersengebieden geactiveerd worden in het ABA-model. Kunt u de doelstellingen verduidelijken?

Het klopt dat leptine niet de enige invalshoek is de mechanismen onderliggend aan anorectisch gedrag te ontrafelen. Ik heb ter verduidelijking tekst toegevoegd:

We use two strategies to unravel these mechanisms. One is based on previous work showing that low levels of leptin and alterations in the dopamine system play a role in the development of anorexic behaviors. The second is based on using a genetic mouse model (TRAP2 mice) that allows us to identify neuronal ensembles that get activated upon exposure to the ABA and/or CTA models.

3.3 Belang: Kunt u de 'onderzoekers' als belanghebbenden toevoegen en daarbij hun belangen aangeven?

Ik heb toegevoegd: The scientists involved in the project that have chosen a career in science to serve the human kind.

3.4 Strategie: Kunt u de strategie verder toelichten? Welke onderdelen van dit project zijn gerelateerd aan het bewijzen van de bruikbaarheid van het ABA-model (muis- en modelgericht) en welke onderdelen zijn direct transleerbaar? Met name de vraag of en hoe (resultaten van) het onderzoek een bijdrage kan leveren aan de aanpak / behandeling van anorexia nervosa is hier relevant.

Het project is vooral fundamenteel van aard, waarbij we mechanismen willen ontrafelen in diermodellen waarvan we verwachten dat ze ook onderliggend zijn aan een deel van de symptomen bij anorexia nervosa (zoals hyperactiviteit en angst). Op basis van die mechanismen kunnen therapieën ontwikkeld worden.

Het onderzoek beschreven onder Q3 is in mindere of meerdere mate transleerbaar. Als we vinden dat een drug effectief is in het onderdrukken van anorectisch gedrag dan opent dat de mogelijkheid te onderzoeken of dat een therapie kan worden bij de mens. Als we met behulp van genetische modificatie (het modificeren van genactiviteit of chemogenetica) vinden dat anorectisch gedrag onderdrukt wordt is dat in mindere mate transleerbaar omdat genterapie bij de mens nog verder ontwikkeld moet worden (maar dat gaat nu wel heel snel).

Ik heb bij 3.4.2 toegevoegd:

The project is primarily fundamental in nature, as we aim to unravel mechanisms in animal models that we expect also underlie some of the symptoms in anorexia nervosa (such as hyperactivity and anxiety). Therapies can be developed based on these mechanisms.

The research described under Q3 is translatable to a greater or lesser extent. If we find that a drug is effective in suppressing anorexic behavior, this opens the possibility of investigating whether it can become a therapy in humans. If we find that anorectic behavior is suppressed by the genetic modification strategies we use (modifying gene activity or chemogenetics), this is less translatable because gene therapy in humans still needs to be further developed (but that is now happening very quickly).

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

De DEC vraagt zich af wat de noodzaak is van 4 groepen voor alle experimenten. U heeft toegelicht dat vier groepen maximaal is. Zou 2 groepen voldoende zijn (en onder bepaalde omstandigheden 1 of 2 additionele groepen)? Hierdoor zou het aantal aangevraagde proefdieren veel lager uitkomen. Als onder bepaalde voorwaarden met 2 of met 3/4 groepen gewerkt moet worden dan zou daarvoor een go/nogo criterium geformuleerd kunnen worden. Wilt u dit overwegen?

Dit is een goed punt dat ik opneem:

Number of groups:

The ABA model is characterized by the presence of a running wheel (or disc) and food restriction and done with up to 4 groups. To control for the impact of running per se, a "no running" group is included that is food restricted. To control for food restriction per se, an ad libitum fed group is included with access to a running wheel (or disc). Besides these 2 groups and the ABA group there is an ad libitum fed sedentary group which allows to determine the role of running or food restriction (in comparison with the other control groups). Depending on the outcome of the experiments and based on our experience, in most cases we early on drop the sedentary ad lib fed group. In case we see that the running wheel fed ad lib group and the food restriction group with no wheel show no difference in the outcome but contrast with the ABA group, we usually keep the running wheel fed ad lib group as only control group for the ABA group.

For the ABA-CTA combination we usually have as controls CTA only but with presence of a running wheel. We also have two similar groups that are not injected with LiCl but are exposed to the same procedure to control for the drive to eat the palatable food. Depending on the outcome we drop usually the CTA only groups.

In these and other experiments we try to use as few groups as possible, but always based upon outcome data and in discussion with the animal welfare body. As we are not allowed to use more animals than asked for in this CCD project, we "maximized" the number of animals to avoid to break the law. Based on our experience we usually use less than half of the total amount of animals we are allowed to use.

Ik heb ook Go/Nogo criteria opgenomen in de berekening van het aantal dieren.

Kunt u toelichten hoe u de leptinedosering bepaalt?

De leptine dosering is overgenomen uit de literatuur en gebaseerd op eigen ervaring. De dosis varieert van 1-5 mg/kg als het subcutaan wordt toegediend.

In de legend van Fig 1 heb ik toegevoegd: The dose of leptin is in the range of 1-5 mg/kg (based upon literature and own experience) and administered subcutaneously.

Kunt u de aantallen dieren die u per groep aanvraagt onderbouwen, b.v. op basis van uw ervaring uit eerder onderzoek of het resultaat van een powerberekening?

We hebben toegevoegd:

For each workprotocol we will determine group sizes based upon power calculations. In most cases effect sizes are based upon results from previous studies such as on food related decision making tasks which have effect sizes in the range of 1.25-1.3. If we have a minimal N: 12 per group (allowing for 2-3 dropouts), it will yield a power of at least 80% at a significance level of 5% for effects of $d=1.25$ and higher. The animal welfare body will evaluate and if necessary

discuss the group sizes and power calculation with us before approving the protocol.

U gaat 12 neurale ensembles onderzoeken. Is dit aantal gebaseerd op de capaciteit van de groep of op het aantal aandachtsgebieden? Wilt u de onderbouwing toevoegen?

Het is vooral gebaseerd op de capaciteit van de groep. We verwachten meer dan 12 neurale ensembles te vinden maar selecteren daaruit op grond van genoemde criteria die ensembles waarvan we de belangrijkste rol verwachten in het beïnvloeden van anorectisch gedrag. In het project voorstel waar we 12 ensembles noemen is toegevoegd:

The "up to 12" ensembles is mainly based on the capacity of the group. We expect to find more than 12 neuronal ensembles, but based on the criteria mentioned below, we select those ensembles that we expect to play the most important role in influencing anorexic behavior. To justify further investigation of a neuronal ensemble it needs to be: 1. Specifically activated in the ABA model or ABA+CTA model and not in control groups and 2. Its transcriptome should respond to exposure to the ABA or ABA+CTA model. If more than 12 ensembles are fulfilling these criteria, further prioritization is based on: 3. Administration of leptin suppresses the engagement of the ensemble and 4. The ensemble is connected to the dopamine system.

B. De dieren: U schakelt van proefdier muis naar proefdier rat in het geval dat de bloedafname bij de muis niet voldoende bloed op kan leveren voor het onderzoek. Kunt u onderbouwen of en waarom metingen aan de muis en aan de rat vergelijkbare en zinvolle resultaten opleveren?

Wij zien dat blootstelling bij de muis en bij de rat tot vergelijkbaar gewichtsverlies leidt (Scharner 2021). Ook de neuroendocriene reacties ook vergelijkbaar. Muizen krijgen wel ongeveer 2x zo lang toegang tot eten omdat ze kleiner zijn en het relatief meer energie kost voor muizen om op temperatuur te blijven.

Toegevoegd: We see that ABA exposure leads to comparable weight loss in mice and rats (Scharner 2021). The neuroendocrine responses are also similar. Mice get access to food for about twice as long because they are smaller and it takes relatively more energy for mice to maintain their temperature.

C. Huisvesting en verzorging:

Gedurende 12 weken vindt individuele huisvesting plaats. Dat veroorzaakt (extra) ongerief. Kunt u de redenen hiervoor onderbouwen?

Ik heb de tekst aangepast:

Animals are housed individually when they have access to a running wheel, when they have a brain cannula and when we measure food intake. To obtain outcome data from individual animals, we need to house the animals individually in cages with running wheels to record running of individuals. Similarly for food intake we need to house animals individually. Animals with fiber optics or cannulas implanted will be socially housed as much as possible. Brain implants are often damaged by gnawing by cagemates which can result in pain in animals with implantations. We will house animals individually for up to 12 weeks, but we keep this period as short as possible. When possible we will house them with other animals separated by a semitransparent wall.

De mannelijke dieren worden niet teruggeplaatst. Kunt u aangeven of dit ook voor de vrouwelijke dieren geldt? Wat gebeurt er met de 2/3 ongebruikte mannelijke dieren?

Ik heb toegevoegd: After individually housing females are group housed.

Males raised by breeding surplus will be made available for other experiments and other researchers. If we find no destination for these males we will kill them.

E. Humane eindpunten

De incidentie van het totale aantal dieren ontbreekt. Kunt u het totaal vermelden?

Toegevoegd: Surgery; 5% incidence expected: 110

Behavioural experiments; 1% incidence expected: 25

ABA model: up to 10% reached HEP in the experimental group (not in control groups) incidence expected: 120

Fiber photometry; up to 20% (including 5% of surgery HEPs); due to gliosis around the optic fiber tip and poor expression of fluorophore there is a relatively high number of dropouts (animals that have to be killed because there is no signal detected) while we already optimized procedures as best as we can. incidence expected: 330

Thus, in total we expect to reach the HEP up to 585 times (7% of total).

De percentages komen niet overeen. Onder E. staat dat 20% van de dieren een humaan eindpunt bereikt en in de tabel staat 10%. Wilt u overall het juiste percentage vermelden?

Aangepast in E naar 10%

Bij 5% uitval dieren is het aantal met 1,05 vermenigvuldigd, maar dat moet gedeeld worden door 0,95 om het correcte aantal benodigde dieren te berekenen. Kunt u dit overall controleren en de aantallen aanpassen?

Hoewel het correct is dat gedeeld moet worden door 0,95 bij 5% en door 0,9 bij 10% is het verschil marginaal: 0,2% desalnietemin heb ik de cijfers aangepast.

F. Classificatie van ongerief

Er is voor een deel van de dieren sprake van ernstig ongerief. Kunt u aangeven hoe u het (ernstige) ongerief monitort en hoe dat mogelijk helpt om de mate van ongerief te beperken?

Ik heb dit uitgebreider beschreven:

We have a strict HEP to prevent the severity level 'severe'. During ABA exposure, the animals are observed 2-3 times a day and checked for activity, cold legs and tail, posture, poorly groomed coat and the weight of the animals, feed and water are recorded in the daily checklist and action is taken based on the HEP criteria, if necessary. If animals eat less than 1 (mice) or 5 (rats) grams of food for 2 days they will get additional food up to 1 (mice) or 5 (rats) grams of food in their cage. If animals lose more than 20% of weight (recorded after the feeding period), they are removed from the experiment and killed.

U geeft aan dat honger en misselijkheid als licht ongerief ervaren zullen worden. Zou dit een onderschatting kunnen zijn? Kunt u de mate van ongerief onderbouwen?

Bij experimenten waar dieren tot 10% lichaamsgewicht verliezen door voedselrestrictie zal er wat honger zijn, maar de conditie van deze dieren is over het algemeen beter: ze stapelen minder vet en de zijn actiever. Aan het eind van blootstelling aan het ABA model ontstaat er matig ongerief als dieren 15-20% aan lichaamsgewicht verloren hebben. De misselijkheid door injectie van Lithium Chloride duurt doorgaans een uur (gebaseerd op het gedrag dat de dieren laten zien) en het is eenmalig, vandaar dat we het inschatten als licht ongerief.

Toegevoegd: The nausea caused by injection of Lithium Chloride usually lasts an hour (based on the behavior shown by the animals) and it is done only once

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

De dodingsmethode is door decapitatie zonder verdoving of cervicale dislocatie. In Richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV staat dat dit geoorloofde methoden zijn, echter cervicale dislocatie: Alleen voor knaagdieren van minder dan 1 kg. Knaagdieren van meer dan 150 g worden verdoofd. Decapitatie mag alleen wanneer andere methoden niet mogelijk zijn. Kunt u dat toevoegen?

Ik heb dit gewijzigd in:

We will use carbon dioxide as standard procedure. If we need to perfuse animals for immunohistochemistry we will use anesthetics. To perform single-cell RNA sequencing with brain cells, we must perform decapitation as we need to isolate fresh brains and cells

Niet Technische Samenvatting

Kunt u nagaan of de aantallen zoals genoemd in de NTS overeenkomen met de aantallen zoals vermeld in het projectvoorstel en de bijlage?

We hebben de aantallen aangepast en in overeenstemming gebracht met de nieuwe aantallen in de bijlage.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het project betreft exploratief fundamenteel onderzoek, waarin de rol van leptine en leptine-receptoren in anorexia nervosa centraal staat. Anorexia nervosa is een complexe, psychosomatische aandoening die moeilijk te behandelen is en waarvoor een eenvoudige therapie onhaalbaar lijkt. Men wil de rol van leptine in hongergevoel, hyperactiviteit en angst onderzoeken zoals dit optreedt bij mensen met anorexia nervosa. Hyperactiviteit en angst is met elkaar verweven in het dopamine-circuit. Als begrepen wordt hoe dat neurale circuit werkt dan is er een eerste aanzet naar een mogelijk therapeutisch aanknopingspunt. Hiervoor heeft men twee belangrijke invalshoeken: leptine en de genetisch gemodificeerde muis die helpt om vast te stellen welke hersengebieden geactiveerd worden in het eetstoornismodel (ABA-model). Daarbij zullen verschillende technieken op jongvolwassen dieren onderzocht worden.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de rol van leptine in hongergevoel, hyperactiviteit en angst te onderzoeken zoals dit optreedt bij mensen met anorexia nervosa. Het uiteindelijke doel van het project is om het neurale circuit en de aspecten van het circuit te begrijpen, waardoor het mogelijk aanknopingspunten biedt om het mechanisme van anorexia nervosa te begrijpen en om behandelmethoden te ontwikkelen. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het neurobiologische onderzoeksveld en de behoeften vanuit de patiënten met anorexia nervosa.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers en patiënten met anorexia nervosa. De (gemodificeerde) muizen en ratten hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van de dierproeven, het (ernstige) ongerief en de vroegtijdige dood. De onderzoeksgroep zet zich al jaren in voor onderzoek naar eetgedrag en richt zich nu specifiek op onderzoek naar anorexia nervosa. Voor de individuele onderzoeker kan het van groot belang zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe. Humane anorexia nervosa-patiënten en hun omgeving hebben een groot belang bij kennis over het ontstaan van de ziekte en een uiteindelijke behandeltherapie.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de zeer ervaren onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Er worden verschillende losstaande (aan elkaar gerelateerde) hypothesen getest waarbij geen vragen gesteld en doelen benoemd worden, maar technieken worden toegepast. De DEC heeft zich wel afgevraagd wat de noodzaak van de vier experimentele groepen is. Als twee groepen (met en zonder

voedselrestrictie) voldoende zou zijn dan zou daardoor het aantal proefdieren mogelijk veel lager kunnen zijn. Dit is voldoende toegelicht door de onderzoeker. Daarnaast worden in de muis diverse modellen (ABA, CTA) ingezet en gestapeld. De DEC heeft gediscussieerd over hoe gecontroleerd wordt of de processen tijdens anorexia nervosa in de mens uiteindelijk op dezelfde manier verlopen. Tussen mens en knaagdieren zijn tenslotte veel verschillen. De onderzoekers hebben dit voldoende toegelicht in de aanvraag. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die grotendeels voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Gedurende maximaal 12 weken vindt individuele huisvesting van dieren plaats die toegang hebben tot een loopwiel, dieren met hersencanule en als de voedselinname gemeten wordt. De langdurige individuele huisvesting is in deze gevallen nodig voor de uitkomstgegevens en gezondheid van de dieren en veroorzaakt volgens de DEC extra ongerief. De redenen zijn volgens de DEC voldoende onderbouwd.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er worden jongvolwassen muizen en ratten ingezet, vergelijkbaar met de levensfase van de humane anorexiapatiënten, waarvan de meeste dieren gemodificeerd zijn. De muizen en ratten zullen licht tot matig ongerief ervaren door o.a. hongergevoel, misselijkheid, individuele huisvesting, bloedafname, injecties, bewegingsbeperking, gedragstesten en de operatie. Er wordt pre-, peri- en postoperatieve anesthesie en analgesie toegediend tegen de pijn. De DEC heeft zich afgevraagd of licht ongerief door honger en misselijkheid bij de dieren geen onderschatting is en de onderzoeker heeft voldoende onderbouwing gegeven voor de mate van dit ongerief. Een andere discussie betrof de omschakeling van proefdier muis naar proefdier rat in het geval dat bloedafname bij de muis niet voldoende bloed op kan leveren voor het onderzoek. Er is volgens de DEC voldoende onderbouwd waarom metingen aan de

muis en aan de rat vergelijkbare en zinvolle resultaten kunnen opleveren. De DEC vindt wel dat er extra ongerief is doordat de dieren maximaal 12 weken individueel gehuisvest worden. Voor een deel van de dieren (72 muizen) zal er sprake zijn van ernstig ongerief door alsnog overlijden na de stereotactische chirurgie. De monitoring van het ongerief en het beperken van de mate van ongerief is volgens de DEC voldoende toegelicht.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mentaal aangetast door o.a. blootstelling aan de diermodellen, de voedselrestricties, de gedragsexperimenten, de operatie onder algehele verdoving, de individuele huisvesting en ten slotte door de vroegtijdige dood.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren (10%) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is volgens de DEC hoog maar goed ingeschat.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De ontwikkeling ten aanzien van het gebruik van humaan bloed van anorexiapatiënten voor onderzoek wordt gevolgd en waar mogelijk ingezet om dierproeven te vervangen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Zo worden waar mogelijk dieren binnen het project meerdere malen ingezet waardoor minder dieren nodig zijn, daarbij rekening houdend met het cumulatieve ongerief.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden zorgvuldig gemonitord en een deel van de muizen ondergaat een operatie onder verdoving waarvoor pre- en postoperatief pijnstilling toegediend zal worden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen met name vrouwelijke dieren gebruikt worden. De DEC begrijpt de noodzaak van het gebruik van met name vrouwelijke dieren in verband met het doel anorexia te reproduceren en dit is voldoende onderbouwd. Er is daardoor wel mogelijk een behoorlijk fokoverschot van de mannelijke dieren en als deze dieren niet ingezet kunnen worden voor een ander project

worden de dieren gedood. Er zullen in de praktijk niet veel (mannelijke) muizen geadopteerd kunnen worden, al is adoptie wel het streven.

19. De meeste dieren worden in het kader van het project gedood in verband met de postmortem analyse van het hersenweefsel. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood. Voor het uitvoeren van single-cell RNA-sequencing met hersencellen is decapitatie (zonder verdoving) noodzakelijk in verband met isolatie hersenen en cellen. Dit is volgens de DEC voldoende onderbouwd.

Een deel van de dieren wordt niet gedood in het kader van het project maar zal indien mogelijk hergebruikt worden. Daarnaast zal een heel klein aantal dieren ter adoptie aangeboden worden, al is volgens de DEC deze mogelijkheid beperkt.

20. De vraag over hergebruik is deels van toepassing omdat de meeste dieren gedood worden in het kader van het experiment, zie C19.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk begrijpen wat de neurale circuits zijn die onderliggend zijn aan hyperactiviteit en angst, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht tot matig ongerief voor in totaal 6326 muizen en 2000 ratten, en ernstig ongerief voor 72 muizen. Het project is wetenschappelijk zorgvuldig maar de ethische afweging is complex, mede omdat het om veel dieren met veel ongerief gaat. Weegt het aantal dieren en de mate van ongerief die deze dieren ondergaan op tegen de mogelijke resultaten van het onderzoek? Anorexia nervosa is een psychosomatische stoornis en door het complexe ziektebeeld lijkt het vinden van een medicijn/behandeling in de nabije toekomst niet realistisch. De DEC ziet dit exploratieve onderzoek als een (kleine en onzekere) stap in een lange weg die nog te gaan is naar een eventuele behandeling van anorexia waarbij de transleerbaarheid van muis naar mens ook nog niet zeker is. Het gaat om fundamenteel onderzoek voor een groot klinisch probleem waarvoor nu nieuwe technieken beschikbaar komen om een heel duidelijke relatie tussen neuronale circuits in een model van anorexia te bestuderen. Deze kleine en onzekere stap kan volgens de DEC tegelijk ook juist een *belangrijke* stap voorwaarts zijn in het begrijpen van de

ernstige (en soms dodelijke) aandoening anorexia nervosa, waar veel (jonge) mensen wereldwijd aan lijden. De DEC ziet, voor zover bekend, geen andere (diervriendelijke) benadering om te onderzoeken hoe de complexe circuits in de hersenen werken dan de nieuwe en geavanceerde technieken zoals beschreven in het project. De DEC vindt dan ook dat de inzet van dierproeven voor de methoden voor dit fundamenteel wetenschappelijke onderzoek gerechtvaardigd is.

Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project ertoe bijdragen dat er meer kennis komt over de neurobiologie onderliggend aan de ernstige aandoening anorexia nervosa die een negatieve invloed heeft op de kwaliteit van leven van patiënten en hun omgeving. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hierbij zullen echter 72 muizen ernstig ongerief ervaren waardoor een Beoordeling Achteraf vereist is.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat onderzoek naar de samenhang tussen satiety/honger, verhoogde motorische activiteit en angst een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. De aanvraag is toetsbaar en er is voldoende samenhang. Ook wetenschappelijk is dit een interessant project. Het gaat echter om een groot aantal dieren met veel ongerief. De onzekerheid (zie ook D2) in dit project en de inzet van het grote aantal dieren wordt door *alle* leden van de DEC beaamd. Voor één van de DEC-leden is dit echter de reden om een negatief advies te geven waarbij ook meetelt dat dit lid niet overtuigd is dat de onderzoeker alle mogelijkheden volledig onderzocht heeft om dierproeven te voorkomen. Dit lid onderschrijft wel de zorgvuldige opzet, beschrijving van het onderzoek en het grote belang om anorexia nervosa beter te begrijpen, maar weegt mee dat de stap vooruit die met dit project kan worden geboekt klein en onzeker is, afgewogen tegen het ongerief van een zeer groot aantal dieren. Voor dit lid is niet voldoende zeker dat dit ethisch gezien de beste weg is om verder te komen met anorexia-onderzoek. De andere leden geven een positief advies omdat het om fundamenteel onderzoek voor een groot klinisch probleem gaat waarvoor nu nieuwe technieken beschikbaar komen, en dat kan volgens de DEC mogelijk essentieel zijn in het begrijpen van de ernstige aandoening anorexia nervosa en de basis vormen voor een mogelijke behandeling.
3. De volgende knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.
 - De DEC heeft gediscussieerd over het mogelijk beter identificeren over de go/gono momenten, zeker gezien het grote aantal maximaal aangevraagde dieren voor de onderzoekersperiode. De keuzes zijn volgens de DEC voldoende onderbouwd. De grote omvang van het project heeft tevens invloed op de haalbaarheid van het project en de DEC is van mening dat de haalbaarheid zorgvuldig onderzocht is.
 - De DEC vindt dat als dieren maximaal 12 weken individueel gehuisvest worden er sprake is van matig ongerief en dit als ongerief opgenomen had moeten worden.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202417980

Bijlagen

2

Datum 28 maart 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 maart 2024. Het gaat om uw project "Neurobiology of anorexia nervosa". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202417980. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

28 maart 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202417980

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: research analist
Afdeling: TN
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2024
Geplande einddatum: 1 augustus 2029
Titel project: Neurobiology of anorexia nervosa
Titel niet-technische samenvatting: the neurobiologie van anorexia nervosa
Naam DEC: DEC-Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.617,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 28 maart 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD11500202417980
Bijlagen
2

Datum 28 maart 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 28 maart 2024
Vervaldatum: 27 april 2024
Factuurnummer: 2417980
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202417980	€ 1.617,00

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

From: info@zbo-ccd.nl
To: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Cc: [REDACTED] dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD11500202417980
Date: dinsdag 28 mei 2024 11:56:08

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 28-03-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of anorexia nervosa" met aanvraagnummer AVD11500202417980. 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

- De NTS bevat een aantal ingewikkelde termen of vakjargon, zoals neuronale circuits, humane eindpunten, differentiëren, fysiologie. Kunt u lastige termen toelichten of vervangen door eenvoudigere woorden?
- Onder 'Expected impacts/adverse effects' benoemt u dat de gedragstesten licht stressvol zijn. Kunt u kort toelichten wat u meet met de gedragstesten? Kunt u individuele huisvesting ook benoemen als bron van ongerief?
- In de tabel 'estimated numbers per severity' geeft u aan dat maximaal 72 dieren ernstig ongerief kunnen ervaren. Dit komt in de tekst niet naar voren. Kunt u onder 'Expected impacts/adverse effects' toelichten waarom er een kans is op ernstig ongerief?
- Kunt u de NTS in het vanuit de EU verplichte Excel format indienen?

Onduidelijkheden

Kunt u in de bijlage dierproeven, onder F (ongerief) nog een regel toevoegen waarin u per diersoort de percentages aangeeft per ongerief categorie? Kunt u het individueel huisvesten van de dieren ook aangeven als bron van ongerief?

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.

Uw aanvraag zal 7 juni worden besproken in de CCD vergadering. Antwoorden die voor deze datum worden ingediend zullen worden meegenomen in de bespreking van uw aanvraag.

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



www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0800 789 0789

E: 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.

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC 's-GRAVENHAGE

Our reference

Your reference AVD11500202417980

Date Juni 24, 2024

Subject antwoord vragen CCD

UMC Brain Center

Translational Neuroscience

██████████
██████████
██████████████████

██████████████████
██████████████████

In reactie op de vragen gesteld n.a.v. het voorstel 'Neurobiology of anorexia nervosa' met aanvraagnummer AVD11500202417980 antwoord ik hier:

Niet technische samenvatting

- De NTS bevat een aantal ingewikkelde termen of vakjargon, zoals neuronale circuits, humane eindpunten, differentiëren, fysiologie. Kunt u lastige termen toelichten of vervangen door eenvoudigere woorden?

Ik heb de NTS aangepast en de genoemde termen vervangen door eenvoudigere woorden

- Onder 'Expected impacts/adverse effects' benoemt u dat de gedragstesten licht stressvol zijn. Kunt u kort toelichten wat u meet met de gedragstesten? Kunt u individuele huisvesting ook benoemen als bron van ongerief?

In het NTS heb ik de gedragstesten verder toegelicht en individuele huisvesting als bron van ongerief toegevoegd.

- In de tabel 'estimated numbers per severity' geeft u aan dat maximaal 72 dieren ernstig ongerief kunnen ervaren. Dit komt in de tekst niet naar voren. Kunt u onder 'Expected impacts/adverse effects' toelichten waarom er een kans is op ernstig ongerief?

In het NTS is aangegeven waarom er kans is op ernstig ongerief.

Visiting address:

██████████
Universiteitsweg 100
3584 CG Utrecht
The Netherlands

Postal address:

██████████
██████████
3508 AB Utrecht
The Netherlands

- *Kunt u de NTS in het vanuit de EU verplichte Excel format indienen?*

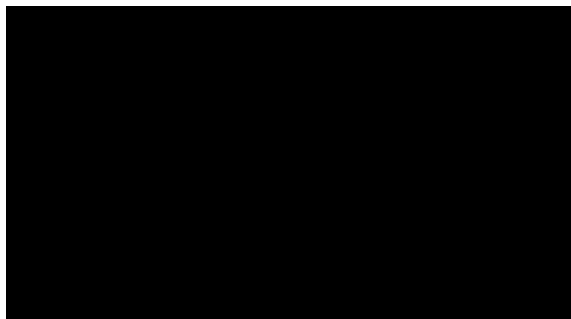
Het NTS is nu in Excel format gezet

Onduidelijkheden

Kunt u in de bijlage dierproeven, onder F (ongerief) nog een regel toevoegen waarin u per diersoort de percentages aangeeft per ongerief categorie? Kunt u het individueel huisvesten van de dieren ook aangeven als bron van ongerief?

In de bijlage dierproeven onder F is per diersoort het percentage ongerief toegevoegd. Individueel huisvesten is als bron van ongerief toegevoegd

Met vriendelijke groet





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD11500202417980

Bijlagen

3

Datum 26 juni 2024

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 28 maart 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neurobiology of anorexia nervosa" met aanvraagnummer AVD11500202417980. 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. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 augustus 2024 tot en met 31 juli 2029.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:

26 juni 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202417980

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 15 mei 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 28 mei 2024 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het ongerief en enkele teksten in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

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

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2030 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

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.

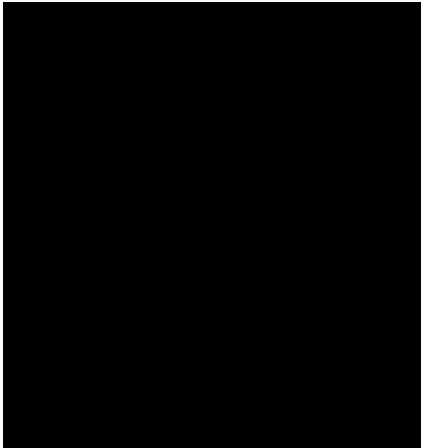
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Datum:
26 juni 2024
Aanvraagnummer:
AVD11500202417980

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2024 tot en met 31 juli 2029, voor het project "Neurobiology of anorexia nervosa" met aanvraagnummer AVD11500202417980, na advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is research analist verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 maart 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 15 mei 2024;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Exposure to anorexia nervosa models with the purpose to map circuitry and to record and manipulate neuronal activity, zoals ontvangen op 24 juni 2024;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 24 juni 2024;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 15 mei 2024
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 24 juni 2024.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1. Exposure to anorexia nervosa models with the purpose to map circuitry and to record and manipulate neuronal activity			
	Muizen (Mus musculus)	6.326	1,0% Ernstig 29,0% Matig 70,0% Licht
	Ratten (Rattus norvegicus)	2.000	33,0% Matig 67,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD11500202417980

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste 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:

AVD11500202417980

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:
AVD11500202417980

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

Volgens artikel 13b 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.

Beoordeling achteraf

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