



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of 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 10300  
 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	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw

E-mailadres contactpersoon				
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw

E-mailadres gemachtigde [instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl](mailto:instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl)

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein		29 / HP231
Postcode en plaats	6525 EZ	Nijmegen	
Postbus, postcode en plaats	9100	6500HB	Nijmegen

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		

	Telefoonnummer	[REDACTED]
	E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
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.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer [REDACTED]
	E-mailadres	<a href="mailto:instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl">instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl</a>
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input 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 01 - 06 - 2022 Einddatum (t/m) 31 - 05 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Opzet van een nieuwe behandel methode voor depressie: Gen therapie gericht op een specifiek hersengebied middels ultrageluid
3.4		Naam DEC RU DEC Postadres Postbus 9101, 6500 HB, Nijmegen (HP 231)

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

[dierexperimentencommissie@radboudumc.nl](mailto:dierexperimentencommissie@radboudumc.nl)

## 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: RadboudUMC / [REDACTED]		Afdeling: [REDACTED]
Straat: Geert Groteplein		Huisnummer: 29 / HP231
Postcode: 6525 EZ	Plaats: Nijmegen	
Postbus: 9101	Postcode: 6500 HB	Plaats: Nijmegen
E-mail: <a href="mailto:instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl">instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl</a>		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:  
Kostenplaats: [REDACTED] CDL projectnummer: 2022-0006

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven    2
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

 Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD 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	[REDACTED]
Functie	IvD
Plaats	Nijmegen
Datum	07 - 04 - 2022
Handtekening	[REDACTED]



Centrale Commissie Dierproeven

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

### 1 General information

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound |

### 2 Categories

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

---

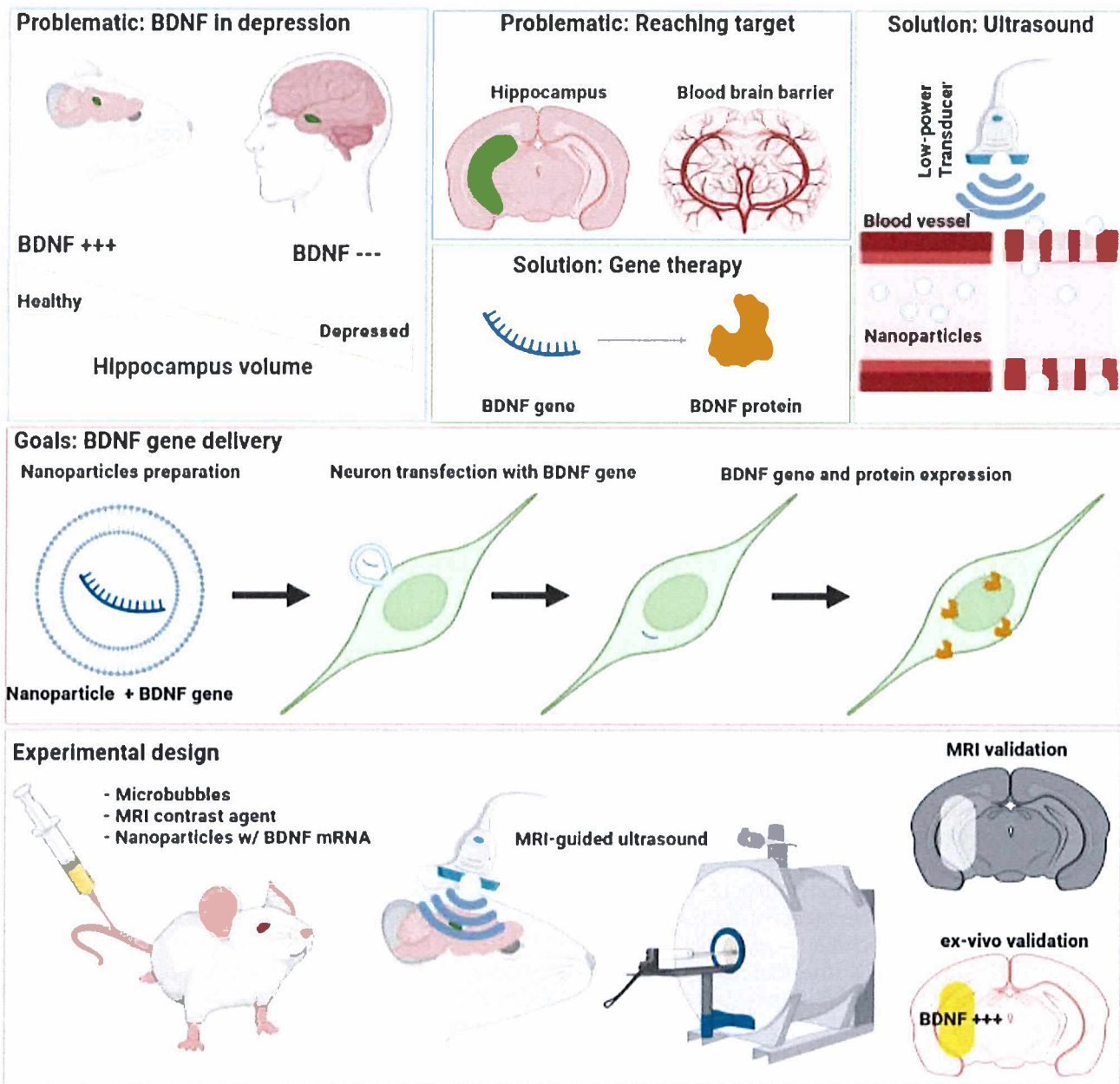
Anxiety-related disorders and depression are highly common and burdensome stress-related brain disorders that often co-occur. Anxiety and depression have a lifetime prevalence of 33.7% [1] and 20.6% [2], cost Europe 74.4 and 113.4 billion euro per year [3], and cause 27 and 65 million Disability Adjusted Life Years [4], respectively. Selective serotonin reuptake inhibitors (drugs like Prozac) are frequently prescribed as first-line treatment. However, 30-40% of the patients do not respond to these drugs [5]. This poses an urgent need for the development of new therapeutic strategies.

One core feature of these disorders is a reduced hippocampal volume, which has been observed in both preclinical and clinical studies [6]. This is believed to be due to reduced expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) growth hormone in the hippocampus [7]. BDNF is one of the most important molecules involved in stress-related disorders and a key neurotrophic player in antidepressant treatment which is strongly expressed in the hippocampus. The neurotrophin hypothesis - which is based on animal studies - postulates that symptoms associated with anxiety disorders and major depressive disorder, both pathological and behavioural, are a result of decreased neurotrophic (i.e. BDNF-mediated) support, and conversely, that increasing neurotrophic support would lead to the resolution of these symptoms [8]. In support, BDNF administration into the hippocampus produces anxiolytic and antidepressant-like effects in animal models of depression [9]. Like in animals, decreased BDNF mRNA and protein levels are found in the postmortem hippocampus of depressed suicide victims [10]. Given that the elevation of BDNF in the hippocampus represents a promising agent for the treatment of stress-related disorders, the most important question is: how will we get BDNF specifically into the hippocampus of patients? Because of obvious ethical reasons, molecules cannot be administered directly into the human brain. Treatment of humans can only be achieved by administration of molecules through peripheral (i.e., non-brain) routes. However, peripheral BDNF administration is not effective because BDNF cannot cross the blood-brain barrier, a system at the blood vessel level which blocks the delivery of large molecules like mRNA, DNA, and proteins into the brain [11]. The major obstacle is that no methods exist to get BDNF over the blood-brain barrier selectively into the hippocampus.

This proposal aims to investigate whether a method can be developed to deliver BDNF across the blood-brain-barrier. This can be achieved through lipid nanoparticles. The lipid nanoparticles are based on lipoproteins that transport fat throughout the body. Lipid nanoparticles are <100 nm in diameter and consist of (phospho)lipids, polyethylene glycol-conjugated lipids and ionizable cationic lipids. Lipid nanoparticles can carry mRNA, like BDNF mRNA. Lipid nanoparticle-mRNA formulations protect mRNA molecules from nuclease degradation and increase nanoparticle stability in physiological fluids [12,13]. When the mRNA is brought to the right location in the body, it can be used for protein synthesis by the body's own machinery. COVID-19 vaccines are examples of lipid nanoparticle-mRNA therapeutics [14]. Lipid nanoparticles do not cross the blood-brain-barrier. However, in this project we aim to open the blood-brain-barrier specifically at the level of the hippocampus through the combination of microbubbles and ultrasound. This is critical because, in other brain regions such as the amygdala, BDNF has opposite effects (i.e., increasing rather than decreasing anxiety). We will reversibly open the blood-brain barrier specifically in the hippocampus by using microbubbles together with Magnetic Resonance Imaging (MRI)-guided focused low-power ultrasound in the 0.3-3 Mhz range. Sonication of microbubbles in suspension in the blood stream causes cavitations which loosen the blood-brain barrier (by affecting the tight junctions between endothelial cells), allowing small molecules such as nanoparticles to cross the blood-brain-barrier. This opening is mechanical, transient, non-invasive, and safe, and the integrity of the blood-brain barrier restores rapidly during 6-24 hours [15]. Furthermore, the focal beam of the ultrasound can reach a target the size of a grain of rice or smaller, sufficient to reach selectively different targets in the brain [16]. When the ultrasound is targeted to the hippocampus the lipid nanoparticles will enter the hippocampus and not other brain regions. This is because the neurons are directly contacting the basement membrane of the blood-brain-barrier which is opened by the ultrasound procedure. Subsequently, in the hippocampus the BDNF mRNA is translated to BDNF protein, leading to an increase in BDNF protein levels and amelioration of anxiety- and depression-like behaviour.

To get this working, the ultrasound sonication protocol needs to be balanced between sufficient blood-brain barrier opening and the prevention of tissue damage. Furthermore, it is important to consider that brain regions are connected to each other, and thus that off-target effects may still occur through the transport of mRNA or protein from the target region to off-target regions, leading to unwanted effects. These limitations hinder the use of this non-invasive ultrasound method immediately in humans. This is where animal models come into play, they will allow us to investigate for the first time MR-guided focused low-power ultrasound to bring lipid nanoparticles to a specific brain region for local therapeutic effects within a laboratory setting, and test hypotheses based on a causal basis. The homogeneity of the groups (controlled genetic and environment) in animals allows for reduced group size compared to clinical cohorts which have to account for co-morbidities and population variability. Lipid nanoparticles received considerable attention in recent years to have great future perspectives for the development of vaccines [16]. Given that lipid nanoparticles can efficiently deliver mRNA into the cells [12] they can be used as a versatile nucleic acid carrier to change gene expression in organs, like the brain. Therefore, the findings of this study will add a new layer of information to our current knowledge of new treatment avenues, and provide the proof-of-concept to guide further preclinical studies to assess safety and efficacy, and to potentially conduct translational studies in the future to validate the use of lipid nanoparticles and ultrasound technology together for the treatment of stress-related disorders such as anxiety and depression.

As an animal model, we choose the mouse, because the MRI parameters and ultrasound technology we will be using are well established for mice. Furthermore, the scaling from small (mouse) to large (rat) rodents can be a complicated task because the ultrasound beam is strongly affected by the thickness of the skull [21]. We will therefore use mice to pilot the MRI-guided ultrasound targeting of the lipid nanoparticles with BDNF mRNA to the hippocampus. If successful, we will use the serotonin transporter knockout mouse model to validate the intervention. This mouse model is chosen because serotonin transporter knockout rodent (mouse and rat) models exhibit low BDNF (mRNA and protein) levels in the hippocampus [17, 18] as well as anxiety- and depression-like behaviour [18]. Serotonin transporter knockout mice and rats demonstrate similar neurobehavioral endophenotypes, showing that the effects of serotonin transporter knockout are conserved across species [19]. Furthermore, we have recently demonstrated that viral-mediated up-regulation of the BDNF gene (exon IV) in the hippocampus of the serotonin transporter knockout rat model leads to a reduction in anxiety- and depression-like behaviour [20]. In this study, exon IV and total BDNF mRNA and BDNF protein levels were elevated 2 weeks after viral infusion and remained elevated for another 2 weeks. The latter 2 weeks provide sufficient time to conduct behavioural tests. This provides us a strong basis to test the efficacy of the MRI-guided ultrasound targeting of the lipid nanoparticles with BDNF to the hippocampus and test its effects on behaviour. The figure below summarizes the aim of this project:



**Context:**

This project is a high risk-high gain project, and funded by the Dutch Research Council as such. That is, the grant call was specifically aimed at risky projects. There is a risk for failure, but this is acceptable because with success the gain is high. If the project is successful, it can lead to the start of a new preclinical research line on exploring novel treatment avenues for stress-related and other psychiatric disorders. A recent study demonstrated the delivery of fluorescent-tagged nanoparticles to the mouse hippocampus using focused ultrasound [15], showing feasibility. Nonetheless, to the best of our knowledge, the use of the approach we present here has not previously been used to alter gene expression in a specific brain region.

**References:**

1. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci* **2015**, 17 (3), 327-35.
2. Hasin DS et al. Epidemiology of Adult DSM-5 Major Depressive Disorder and Its Specifiers in the United States. *JAMA Psychiatry* **2018**, 75 (4), 336-346.
3. Olesen J et al. The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology*. **2012**, 19: 155-162.

4. Whiteford HA et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2013**, 382 (9904), 1575-86.
5. Gaynes BN et al. What did STAR\* D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatr. Serv.* 60, 1439-1445 (2009).
6. Sapolsky RM Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12320-12322 (2001).
7. Yu H & Chen Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 3-11 (2011).
8. Duman RS et al. A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54, 597-606 (1997).
9. Shirayama Y et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22, 3251-3261 (2002).
10. Erbay LG et al. Association of BDNF / TrkB and NGF / TrkA levels in postmortem brain with major depression and suicide. *Psychiatr Danub.* 33, 491-198 (2021)
11. Pardridge WM Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. blood flow Metab.* 32, 1959-1972 (2012).
12. Kulkarni JA et al. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther.* 28, 146-157 (2018).
13. Hou X, Zaks T, Langer R & Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* 2021 1-17 (2021). doi:10.1038/s41578-021-00358-0.
14. Baden LR et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. 384, 403-416 (2020).
15. Morse SV et al. Liposome delivery to the brain with rapid short-pulses of focused ultrasound and microbubbles. *J Control Release.* 2022 Jan;341:605-615. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.12.005. Epub 2021 Dec 10.
16. Papachristodoulou A et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. *J. Control. Release* 295, 130-139 (2019).
17. Homberg JR et al. The serotonin-BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 43, 35-47 (2014).
18. Xiamin W et al. Role of the cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in abnormal behaviours of serotonin transporter knockout mice. *Behav Brain Res.* 2022 Feb 15;419:113681.
19. Kalueff Av et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 373-386 (2010).
20. Diniz DM et al. BDNF overexpression in the ventral hippocampus promotes antidepressant-and anxiolytic-like activity in serotonin transporter knockout rats. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5040 (2021).
21. Deffieux T, Konofagou E. Numerical study of a simple transcranial focused ultrasound applied to blood-brain-barrier opening. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 57, 2637-2653 (2010).

## 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

### Immediate goal:

This project is about developing a gene delivery system to elevate BDNF levels selectively in the hippocampus but not other brain regions, with the ultimate purpose to investigate whether this will alleviate anxiety- and depression-like symptoms in mice. We aim 1) to use for the first time targeted lipid nanoparticle BDNF mRNA delivery to the mouse hippocampus with the help of MRI-guided low intensity-pulsed focused ultrasound and 2) to validate this approach in a mouse model for anxiety and depression.

Our hypotheses are as follows:

MRI-guided ultrasound will facilitate the entry of lipid nanoparticles loaded with BDNF mRNA (exon IV) into the hippocampus, leading to increased BDNF expression in this area of the brain (relative to off-target regions like the amygdala), and will not cause tissue damage.



MRI-guided ultrasound targeting of lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA (exon IV) to the hippocampus will up-regulate BDNF protein levels in the serotonin transporter knockout mice and will ameliorate their anxiety- and depression-like behaviour.

**Ultimate goal:**

If successful, this project would pave the way for new preclinical research further exploring safety and effectivity of the lipid nanoparticle-MRI-ultrasound approach for stress-related and other psychiatric disorders.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We have experience with the investigation of BDNF in animal models for depression [1, 3, 4], providing us the scientific knowledge on the rationale of the study. We also have extensive experience with behavioural measurements in rodents (> 150 articles). We have furthermore experience with focussed ultrasound and MRI in mice [2], as well as ex vivo analysis of BDNF mRNA and protein expression analysis [3, 4]. To make the lipid nanoparticles, we collaborate with the department of Internal Medicine of the Radboudumc with expertise in Biomedical Engineering and Nanomedicine [5, 6].

**References**

1. Diniz DM et al. BDNF overexpression in the ventral hippocampus promotes antidepressant- and anxiolytic-like activity in serotonin transporter knockout rats. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5040 (2021).
2. Papachristodoulou A. et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. *J. Control. Release* 295, 130–139 (2019).
3. Sbrini G et al. Enrichment environment positively influences depression- and anxiety-like behavior in serotonin transporter knockout rats through the modulation of neuroplasticity, spine, and GABAergic markers. *Genes (Basel)*. 11, 1248 (2020).
4. Caffino L et al. Deletion of the serotonin transporter perturbs BDNF signaling in the central amygdala following long-access cocaine self-administration. *Drug Alcohol Depend.* 205, 107610 (2019).
5. Bernal A et al.. Imaging-guided nanomedicine development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 63, 78–85 (2021).
6. Mulder WJM et al. High-density lipoprotein nanobiologics for precision medicine. *Acc. Chem. Res.* 51, 127–137 (2018).

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 and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

**3.3 Relevance**

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

Scientific relevance:

This project will reveal for the first time whether it is possible to get lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA over the blood-brain barrier and direct it to a specific brain region through MRI-guided ultrasound to ameliorate anxiety- and depression-like behaviour in mice. This research is of interest to behavioural neuroscientists, molecular neurobiologists, pharmacologists, nanotechnology experts as well as psychiatrists, and other clinicians. Our project has, if successful, the potential to inspire future research extending the approach to other agents, other brain regions as well as other disorders. The direct scientific deliverables are:

- Knowledge on the precise ultrasound protocol to temporarily and locally open the blood-brain-barrier.

- Knowledge on the possibility to temporarily open the blood-brain-barrier without causing lasting damage to the blood-brain-barrier.
- Knowledge on the possibility to target BDNF mRNA to specifically the hippocampus using the MRI-guided ultrasound procedure.
- Validation of the lipid nanoparticle MRI-guided ultrasound procedure in an animal model for depression, exhibiting low BDNF levels in the hippocampus.

#### Towards societal relevance:

Major depressive disorder is one of the leading causes of disability, morbidity, and mortality worldwide which has been estimated to be the most common global mental disorder by the year 2030 [1, 2]. In addition to economic burden, depression is often comorbid with anxiety disorder and decreased quality of life [3]. Depression also increases the risk of obesity, diabetes, and cardiovascular diseases [4]. The current therapeutic strategies usually take many weeks to manifest and a large number of depressive patients (30-40%) still do not respond to them [5]. Thus, the development of new treatment strategies presenting a significant improvement in depression-related symptoms would have a tremendous impact on public health. This study will be one of the first attempts to examine the BDNF mRNA delivery in a specific brain region through combining lipid nanoparticle and focused low-power ultrasound technologies together as a potential solution to overcome the current bottlenecks in the development of therapeutic strategies for stress-related disorders such as anxiety and depression. In support of this, these methods are currently being used as promising and safe therapeutic platforms for treating a wide range of diseases in preclinical models [6]. These methods are also being tested in clinical studies [7-8], but require more extensive testing before application in clinical testing. Animal models offer the unique possibility to monitor and trace the successful lipid nanoparticle delivery at the right site in the brain under different disease conditions, as compared to studies in humans. The knowledge obtained through animal research can aid the piloting in humans. We use the serotonin transporter knockout mouse model to validate the intervention. Serotonin transporter knockout rodent models have a high translational value as they show similar stress sensitivity as reported in humans carrying a 5-HTT polymorphism [9]. Furthermore, we have demonstrated that full 5-HTT knockout rats behaviourally and neurally resemble humans carrying the low activity short allelic variant of the 5-HTT promoter polymorphism [10]. These individuals are at risk for depression [11] and exhibit reduced BDNF in their blood cells [12]. If successful, this project would pave the way for new preclinical research further exploring the long-term safety and effectivity of the lipid nanoparticle-MRI-ultrasound approach for stress-related and other psychiatric disorders.

#### **References**

1. Kiecolt-Glaser, J. K. & Glaser, R. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. *J. Psychosom. Res.* 53, 873–876 (2002).
2. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, e442 (2006).
3. Pollack, M. H. Comorbid anxiety and depression. *J. Clin. Psychiatry* 66, 22 (2005).
4. Penninx, B. W. J. H., Milaneschi, Y., Lamers, F. & Vogelzangs, N. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. *BMC Med.* 11, 1–14 (2013).
5. Gaynes, B. N. et al. What did STAR\* D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatr. Serv.* 60, 1439–1445 (2009).
6. Shin, J. et al. Focused ultrasound-mediated noninvasive blood-brain barrier modulation: Preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters. *Neurosurg. Focus* 44, E15 (2018).
7. Beccaria, K. et al. Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg. Focus* 48, E10 (2020).
8. Montoto SS, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *front.Mol. Biosci.* <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>
9. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE, Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry.* 2010 May;167(5):509-27.
9. Schipper, P. et al. The association between serotonin transporter availability and the neural correlates of fear bradycardia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 25941–25947 (2019).

10. Bleys, D., Luyten, P., Soenens, B. & Claes, S. Gene-environment interactions between stress and 5-HTTLPR in depression: A meta-analytic update. *J. Affect. Disord.* 226, 339–345 (2018).
11. Molteni, R. et al. Reduced function of the serotonin transporter is associated with decreased expression of BDNF in rodents as well as in humans. *Neurobiol. Dis.* 37, 747–755 (2010).

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

The stakeholders for this project are:

**The researchers:** Will have an innovative technique in hands if the project is successful. The data can be used for future larger grant applications.

**The animals:** Will undergo discomfort, importance of best possible three R application

**Scientific community:** Gain of unprecedented knowledge on a new avenue to treat psychiatric disorders

**Pharma industry:** New potential therapeutic target for drug or treatment development (we do not collaborate with industry for this project)

**Anxiety and depressed patients:** Current pharmacotherapies are effective in a subset of patients. Because it is not known who will respond to available medication, a trial-and-error regime is applied in clinical practice. That is, if a drug doesn't work, the next drug is being tested, and thereafter the next one. If a patient does not respond to the different treatments, a lot of insecurity is being experienced, making the situation of the patients even more depressive. This project may ultimately (beyond the scope of the current project) an outlook for a more effective intervention for these stress-related psychiatric disorders, reducing the time towards recovery.

### 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 overall goal is to pilot and validate a new technology to get BDNF mRNA specifically to the hippocampus. We will use lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA that are directed over the blood-brain-barrier at the level of the hippocampus through MRI-guided ultrasound. The overall design and coherence of the experiments is wrapped around two objectives that will be addressed in two different DAPs during different phases of the project with one clear go/no go checkpoint.

**Objective 1 - Lipid nanoparticle BDNF mRNA delivery to the hippocampus with the help of MR-guided low intensity-pulsed focused ultrasound:** In this objective we will pilot in 4 steps the ultrasound procedure.

Complete procedure: We will use lipid nanoparticles targeting the blood-brain barrier and loaded with BDNF mRNA. Mice will be anesthetized. While under anesthesia, the lipid nanoparticles are intravenously injected together with microbubbles (to 'open' the blood-brain barrier) and an MRI contrast agent (to visualise the lipid nanoparticles during MRI). Mice then undergo -while still being anesthetized- an MRI session and ultrasound is applied to direct the lipid nanoparticles to the hippocampus. Two weeks later (time allowing protein synthesis) the animals are sacrificed under light anesthesia to assess (the absence of) tissue damage (eosin and hematoxylin staining of brain slices) and test if BDNF mRNA and protein levels (qPCR and Western blotting) have increased in the hippocampus in the targeted and not in the non-targeted hemisphere.

4 Steps: In experiment 1 only the ultrasound protocol is being tested (no i.v. injections). In experiment 2 the opening of the blood-brain barrier and tissue damage will be tested, we inject microbubbles and contrast agent i.v. In experiment 3, experiment 2 will be repeated under three 3 ultrasound protocols to determine which ultrasound protocol opens the

blood-brain barrier below the threshold of tissue damage. **Go/no go check point 1:** Only if we find an optimal protocol, experiment 4 will commence. In experiment 4 the full pilot will be conducted: we use the MRI protocol established in 1, the focussed ultrasound established in 2, and optimised in 3, and will test the i.v. delivery of lipid nanoparticles containing BDNF mRNA. Notably, we target one hemisphere only, to have the other hemisphere as control. The outcome of this experiment is a full gene-delivery protocol that can be employed in DAP2. For more detailed information about the procedures, see the descriptions in **DAP1**. Because all procedures take place under anesthesia, the discomfort will be mild to moderate.

**Go/no go check 2:** Only if the experiments in objective 1 are successful (defined as increased BDNF expression in the hippocampus in the absence of tissue damage), we will conduct the experiments in objective 2.

**Objective 2 - Validation of BDNF mRNA targeting approach pilot in Objective 1 in a mouse model for anxiety and depression:** In this objective we will test if the MRI-guided ultrasound targeting of lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA (exon IV) will ameliorate anxiety- and depression-like behaviour and up-regulate BDNF in the hippocampus of serotonin transporter knockout mice up to the level of their wild-type counterparts. The most successful protocol from objective 1 is applied. Notably, now the hippocampus at both hemispheres is targeted. Two weeks after the MRI-ultrasound procedure (time allowing protein synthesis from the mRNA), the animals are tested for anxiety- and depression-like behaviour. The behavioural tests include the elevated plus maze test to measure anxiety, the light-dark box to measure anxiety, the object recognition test to measure memory, the social interaction test to measure social behaviour, and the homecage Phenotyper test in combination with the sucrose consumption test to measure day/night activity and anhedonia. We use a test battery, because depression consists of a constellation of symptoms (anxiety, social withdrawal, cognitive deficits, disturbed sleep/wake patterns, anhedonia). In these tests the mice will be exposed to a novel environment. However, none of these tests involve the usage of a stressor. Finally, the mice are sacrificed under light anesthesia to assess if mRNA and protein BDNF levels (qPCR and Western blotting) have increased in the hippocampus of the serotonin transporter knockout mice. For more detailed information about the procedures, see the descriptions in **DAP2**. Because the injection and MRI-ultrasound procedure takes place under anesthesia, and the behavioural test are all associated with mild discomfort, we estimate that the total discomfort will be mild.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

In objective 1 [DAP 1] we pilot the MRI-guided focussed ultrasound procedure to bring lipid nanoparticle BDNF mRNA over the blood-brain barrier to the mouse hippocampus. In objective 2 [DAP2] we will test this procedure in a mouse model exhibiting reduced BDNF levels in the hippocampus and displaying anxiety- and depression-like behaviour. We have two go/no go decision points: 1. We will only execute experiment 4 of the pilot in Objective 1 if experiment 3 of the pilot is successful (i.e. ultrasound protocol to open the blood-brain-barrier without causing tissue damage). 2. We will only commence with objective 2 if experiment 4 of the pilot in objective 1 is successful.

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	Pilot
2	Behaviour



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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Pilot

### 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.

**In DAP 1 we will pilot the ultrasound procedure to safely and reversibly open the blood-brain barrier towards the delivery of lipid nanoparticles loaded with BDNF mRNA to the hippocampus. We will do so in 4 stages, each with their specific primary outcomes listed below:**

Primary outcomes:

1. Detection and guidance of the ultrasound with magnetic resonance imaging (MRI). This is determined using an MRI sequence sensitive to the physiological effects of the ultrasound (elastography) that records physical properties of the tissue (elasticity) and allows visualizing in 3D the location of the ultrasound focal area.
2. Opening of the blood-brain barrier with focused ultrasound. This is determined using an MRI contrast agent.
3. Absence of tissue damage in the hippocampus and adjacent areas. This is determined through ex

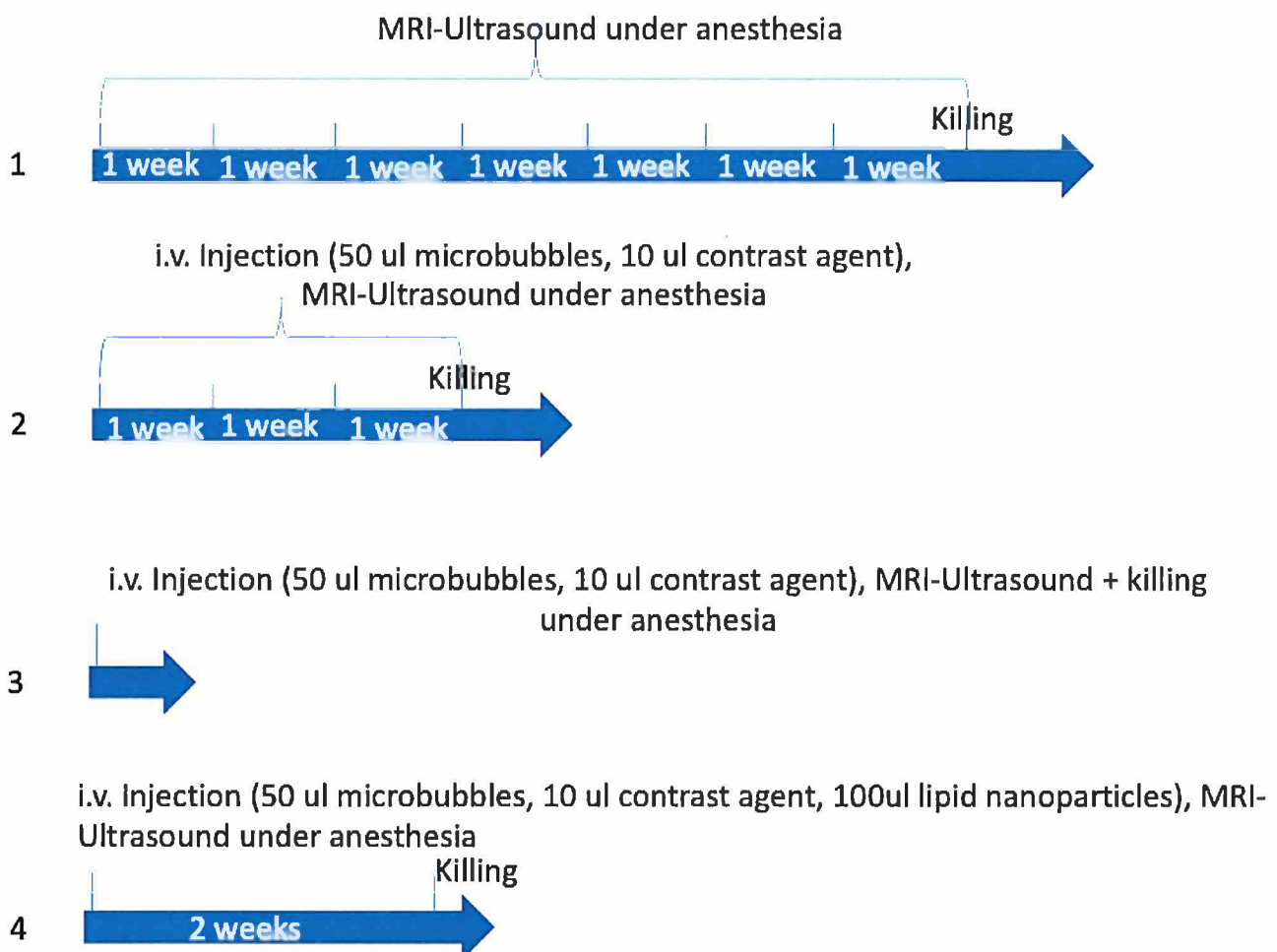
- vivo histological analyses of the microanatomical alterations in the tissue, the presence of bleeding (red blood cells), and neuronal cell damage.
- Delivery of genetic material (BDNF mRNA) into the hippocampus of one hemisphere and not adjacent brain regions. This is determined through RT-Q-PCR and Western blotting the changes in the expression of BDNF mRNA and protein levels in the hippocampus (one hemisphere serves as target and the other hemisphere as control) and amygdala (off target region in both hemispheres).

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

To pilot the procedure to direct lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA to the hippocampus through MRI-guided ultrasound we follow a 4-step approach:

In all cases, before experiments take place, mice will be handled and weighed for three days. On the fourth day the animals are anaesthetized using inhalation anaesthesia (isoflurane). The head will be shaved, the animals are placed on an MRI cradle equipped with a breathing pillow and rectal thermometer, warmed with air using a feedback loop. Ultrasound gel is applied on the head, then an MRI coil is placed, followed by an ultrasound transducer held in a water bath.

These are the timelines of the 4-step approach:



In experiment 1 (MRI protocol establishment), ultrasound is applied using a 650 MHz transducer (10 ms bursts delivered at 1 Hz, for a total duration of 180 s). The relative amplitude of the signal will be modulated until a signal corresponding to the ultrasound focal area is detected with the MRI. The setup to

guide the focused ultrasound will also be trialled during this stage. Because this procedure is non-invasive, and to allow optimization, the animals will undergo up to 8 imaging sessions, each lasting up to two hours and spaced at least 1 week apart. The outcome of this experiment is an MRI protocol to detect and guide focussed ultrasound into the mouse brain. At the end of the last imaging session, while still being anesthetized, the animals are killed to confirm the absence of tissue damage due to ultrasound. In experiment 2 (ultrasound protocol establishment), the same procedure as above will be followed. The difference is that when the mouse is placed on the MRI cradle, thus while the animal is anesthetized, an i.v. catheter is placed into the tail vein to allow for the delivery of microbubbles and MRI contrast agents while in the MRI. Just prior to sonication in the MRI, 50ul of microbubbles (~16 x10<sup>6</sup> bubbles, Bracco Imaging) and 10 ul of the MRI contrast agent Dotarem will be injected i.v.. To allow optimization, while reducing the number of animals that are needed for piloting, the same animals will undergo up to 4 imaging sessions, each lasting up to two hours and spaced at least 1 week apart. The outcome of this experiment is a focussed ultrasound protocol that allows for the opening of the blood-brain barrier (readout: MRI contrast is found in the hippocampus during MRI). At the end of the last imaging session, while still being anesthetized, the animals are killed to confirm the absence of tissue damage. In experiment 3 (protocol optimization), the same procedures as in experiment 2 will be applied. Three different relative ultrasound power amplitudes will be tested, based on the amplitudes determined in experiment 1. This is to establish a protocol well below the threshold necessary to induce tissue damage, while still allowing for ultrasound opening of the blood-brain barrier. Animals will undergo only one session. At the end of the last imaging session, while still being anesthetized, the animals are killed to confirm the absence of tissue damage.

**Go/no go decision point 1:** Only if experiment 3 is successful, we will commence with experiment 4. In experiment 4 (full pilot) - using the MRI protocol established in 1, the focussed ultrasound established in 2, and the combination of these that leads to an effective protocol that is devoid of causing tissue damage in 3- we will test the delivery of 100ul lipid nanoparticles i.v. containing BDNF mRNA to achieve high expression in nerve cells. The lipid nanoparticles will be delivered after MRI-contrast agent confirmation of the opening of the blood-brain-barrier. We target one hemisphere only. The other hemisphere is not targeted and used as control. Two weeks post ultrasound sonication, the mice will be divided into two subgroups: the first subgroup will be perfused under deep anaesthesia (pentobarbital anaesthesia) using phosphate-buffered saline followed by a 4% paraformaldehyde solution. After perfusion, the fixed brains will be collected. The perfused brain will be cut in slices for histological assessments of the hippocampus and adjacent regions (e.g. eosin and hematoxylin staining to determine tissue damage). The other subgroup will be killed by decapitation under light anaesthesia (low dose of isoflurane). The post-mortem brains will be collected and freshly frozen. The frozen brains will be cut in thick slices and we will punch out the hippocampus and adjacent brain regions. We will assess whether BDNF mRNA and protein levels measured through RT-Q-PCR and Western blotting, respectively, are increased in the hippocampus of one hemisphere relative to the hippocampus of the other hemisphere and off-target regions (e.g. amygdala). The outcome of this experiment is a full gene-delivery protocol that can be employed in DAP2.

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

As indicated above, the purpose of this DAP is method establishment. For that reason, we are not planning to implement statistical methods or statistical inferences. Primary outcomes are boolean (Yes/No). If our primary outcomes (see section A) are achieved reliably before the maximal number of animals anticipated is reached, the remaining animals will not be included in the study to minimise animal usage.

The number of animals per experiment is therefore a heuristic-based decision relying on prior personal experience in setting up a similar experiment [1], existing in-house know-how, and available equipment. Finally, the fact that animals may undergo repeated measurements for critical but minimally-invasive and non-destructive experiments provides the added flexibility to further mitigate animal usage.

## Reference

1. Papachristodoulou A, Signorell RD, Werner B, et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. *J Control Release*. 295, 130-139 (2019)

**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
	01	Charles River	Adult	55	F	No	C57BL/6J
	01	Charles River	Adult	55	M	No	C57BL/6J

**Provide justifications for these choices****Species**

We use mice because:

1. Mice have been used in previous ultrasound-MRI studies [e.g. 1].
  2. The equipment we have and need for this project (ultrasound transducer) is only suitable for mice.
  3. MRI protocols we have developed over the years have been selectively developed for mice [2].
- The use of mice thus provides us a good start for the piloting in this DAP. Because this project is a high-risk-high-gain one (see PP), we deem the use of mice the most safe for this project.

**References**

1. Morse SV, Mishra A, Chan TG, de Rosales RTM, Choi JJ. Liposome delivery to the brain with rapid short-pulses of focused ultrasound and microbubbles. J Control Release. 2022 Jan;341:605-615. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.12.005. Epub 2021 Dec 10
2. Mandino F, Vrooman RM, et al. A triple-network organization for the mouse brain. Mol Psychiatry. Oct 14 (2021)

**Origin**

The mice will be obtained from a commercial breeder (Charles River). In the event that surplus C57BL/6J mice are available, we can use them too.

**Life stages**

We will use adult mice (10-12 weeks old). This is the best choice for these experiments because we have access to adult mouse brain atlases and have MRI parameters set for the adult mouse brain, facilitating MRI.

**Number**

The number of animals are expected to be sufficient to get to a working protocol. To minimise the number of animals, we re-use the same animals as procedures are expected to exert minimal impact on the animal welfare.

We need the following:

Experiment 1: N=10 mice/sex

Experiment 2: N=10 mice/sex

Experiment 3: N=15 mice (5 per power level)/sex

Experiment 4: N=20 mice (10 per tissue collection method)/sex.

In total a number of: 20 + 20 + 30 + 40 = 110 mice are requested for DAP1

**Gender**

It is unknown whether the blood-brain barrier acts differently in females and males. While this involves a pilot study without an immediate link to disease, we aim to transfer the best protocol (if successful) to DAP2 where we will focus on anxiety- and depression-related behaviour. These disorders have a female preponderance. To not miss the unforeseen possibility that there are sex differences in settings needed to successfully open the blood-brain barrier or lipid nanoparticle delivery, we will test in this pilot study males and females.

**Genetic alterations**

N/A

**Strain**

We will use C57BL/6J mice to first pilot the MRI-guided ultrasound targeting of the lipid nanoparticles with BDNF mRNA to the hippocampus because the serotonin transporter knockout mice we aim to use in DAP2 have a C57/B6



background. Furthermore, the C57BL/6J mouse strain is a commonly used mouse strain in neuroscience research, rendering the work useful for other researchers in this research domain If successful.

### 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.

### 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?

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

Recovery from anaesthesia after MRI.

Notably, previous studies injecting drugs targeting the receptor for BDNF or liposomes with BDNF into the peripheral system did not report any health issues [2-4].

### References

1. Verheij MM, Vendruscolo LF, Caffino L, Giannotti G, Cazorla M, Fumagalli F, Riva MA, Homberg JR, Koob GF, Contet C. Systemic Delivery of a Brain-Penetrant TrkB Antagonist Reduces Cocaine Self-Administration and Normalizes TrkB Signaling in the Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex. *J Neurosci.* 36(31), 8149-59 (2016).
2. Arora S, Kanekiyo T, Singh J. Functionalized nanoparticles for brain targeted BDNF gene therapy to rescue Alzheimer's disease pathology in transgenic mouse model. *Int J Biol Macromol.* 208, 901-911 (2022).
3. Lin C-Y, Lin Y-C, Huang C-Y, Wu S-R, Chen C-M, Liu H-L. Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble- liposome complex: Preclinical investigation for Parkinson's disease treatment. *J Control Release.* 321, 519-528 (2020).
4. Xing Y, Wen C, Li S-T, Xia Z-X. Non-viral liposome-mediated transfer of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neural Regen Res.* 11(4), 617-22 (2016).

Explain why these effects may emerge.

We keep the animals alive after MRI for piloting in the same animals (reducing the number of animals that are needed) and to allow the BDNF mRNA in the nanoparticles targeted to the hippocampus to be translated into protein.

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

Recovery from anaesthesia cannot be prevented. The animals will be monitored until they have woken up. Because MRI and ultrasound are non-invasive techniques, the animals are expected to fully recover from the imaging sessions. repeated i.v. catheters (up to 4 times, spaced at least one week apart) are not expected to induce sustained discomfort. The ultrasound may cause local tissue (i.e. histological) damage due to temporary opening of the blood-brain barrier in some of the pilot animals. If this occurs, it will be at micro level and very local, and not noticed by the animals. Previous studies already have established that the use of ultrasound is safe [1].

### Reference

1. Morse SV et al. Liposome delivery to the brain with rapid short-pulses of focused ultrasound and microbubbles. J Control Release. 2022 Jan;341:605-615. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.12.005. Epub 2021 Dec 10.

**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.

Since MRI and ultrasound are non-invasive methods, also applied in humans, we do not expect health issues. Therefore, we formulate general human endpoints:  
 General symptoms such as raised fur, hunched back, poor coat conditions, behavioural changes like lethargy and loss of body weight (>15%) relative to the standard growth curve are considered as humane endpoints, after which the animals should be euthanized.

Indicate the likely incidence.

<2%

**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).

Repeated anaesthesia and awakening from anaesthesia (piloting in experiments 1 and 2) is expected to be associated with moderate discomfort. I.v. injection (under anaesthesia, in experiment 2, 3 and 4) and i.p. pentobarbital administration (in experiment 4) are considered to be associated with mild discomfort.

The table below summarizes the handlings and associated estimated discomfort:

Experiment	Handlings	Discomfort	Number of mice
1	8 x anaesthesia; 7 waking up from anaesthesia Under anaesthesia: MRI + ultrasound. Killing during anaesthesia	Moderate	20
2	4 x anaesthesia, 3 times waking up from anaesthesia. Under anaesthesia: i.v. catheterization, MRI + ultrasound. Killing during anaesthesia	Moderate	20
3	1 x anaesthesia; Under anaesthesia: i.v. catheterization, MRI and ultrasound. Killing during anaesthesia	Non-recovery	30
4	1 x anaesthesia; 1 x waking up from anaesthesia. Under anaesthesia: i.v. catheterization, MRI and ultrasound. Killing after pentobarbital induced anaesthesia or by decapitation under light anaesthesia	Mild	40

### 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

The purpose of this project is to increase hippocampal BDNF levels using lipid nanoparticles targeting the blood-brain barrier and loaded with BDNF mRNA and low intensity-pulsed focused ultrasound. It is not possible to use alternatives like brain organoids because brain organoids lack blood vessels. It is also not possible to use animals of a lower level than rodents, because we aim to develop a therapeutic strategy for a brain disorder that requires sufficient brain complexity for modelling. We choose the mouse as a model because the mouse brain bears sufficient complexity to model the targeting of lipid nanoparticles to the hippocampus, which plays a key role in depression.

#### Reduction

The number of animals we use is the minimum required to establish the ultrasound-MRI protocol for safe and efficient delivery of lipid nanoparticles to the hippocampus. We reduce the number of animals needed by conducting pilots (experiment 1 and 2) in the same animals. If the goal of the pilot can be achieved with less animals, we will not use all animals. Because animals can be killed only once for histology, separate groups of mice are needed for different ultrasound procedures in experiment 3 and 4.

#### Refinement

We inject mice with the mixture of lipid nanoparticles, microbubbles, and contrast agents under anaesthesia. The MRI-ultrasound procedure also takes place under anaesthesia. Finally, the killing will take place under anaesthesia. Thereby we minimise suffering for the animals. Furthermore, the animals will be handled by an experienced and trained PhD student, preventing that animals will experience stress when being picked up.

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.

### 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.

**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.

### 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.

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

Mouse brains are needed to study tissue damage and BDNF expression in the hippocampus and adjacent brain areas through histological assessment, RT-Q-PCR, and western blotting, respectively. We will apply these techniques as mentioned in section A of this DAP.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Decapitation under light anesthesia. Decapitation is needed to obtain fresh brain material for RT-Q-PCR and Western blotting. Anesthesia helps to reduce any stress the animal may perceive prior to decapitation. Because the anesthesia will be light, we expect that the anesthesia will not affect mRNA and protein expression levels.

Transcardial perfusion under deep anesthesia. Perfusion is needed to obtain fixed brain material for histological analyses.

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

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

N/A



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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Behaviour

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

**In DAP 2 we will test if the MRI-guided ultrasound targeting of lipid nanoparticles carrying BDNF mRNA will ameliorate anxiety- and depression-like behaviour and up-regulate BDNF in the hippocampus of serotonin transporter knockout mice.**

Primary outcomes:

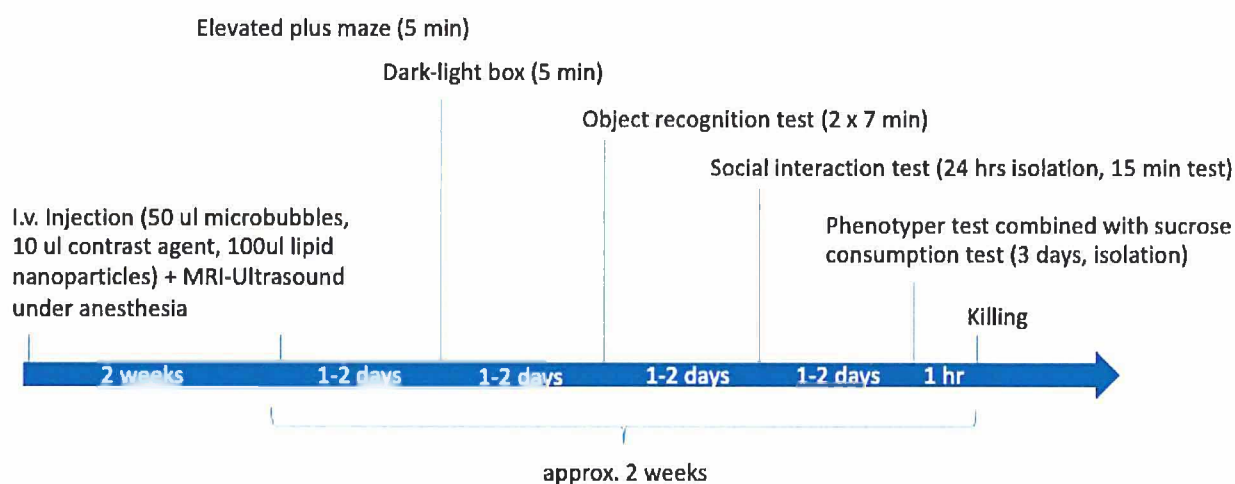
- 1) Plus maze test: Time spent in open arms of the elevated plus maze, index of anxiety
- 2) Light/dark box: latency to enter and time spent in the light box, index of anxiety
- 3) Object recognition test: Discrimination index (time spent on exploring the new location of the object divided by time spent on exploring the old location of object + new location of the object), index of spatial memory.
- 4) Social interaction test: Time spent on non-social interaction, chasing, following, sniffing and allogrooming.
- 5) Phenotyper test: Distance moved per hour over 72 hours, index of wake/sleep patterns

6) Sucrose preference test: Total sucrose intake (corrected for body weight) and % preference for sucrose solution over water, indexes of anhedonia

7) BDNF mRNA and protein: In the hippocampus and adjacent areas, we determine through RT-Q-PCR and Western blotting the changes in the expression of BDNF mRNA and protein levels.

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

In DAP2, the optimised ultrasound protocol in combination with the injection of lipid nanoparticles + microbubbles (results obtained from DAP1) will be applied. If DAP1 is successful (go/no go decision point), the results of DAP1 have led to a full lipid-nanoparticle MRI-ultrasound gene-delivery protocol. The timeline for the experiments is as follows:



**MRI-ultrasound:** The most successful ultrasound protocol from DAP1 will be applied, in this case to both hemispheres. For the details we refer to DAP1, experiment 4. Mice will be anesthetized/ While under anesthesia, the lipid nanoparticles (100 ul) are intravenously injected together with microbubbles (to open the blood-brain-barrier) and an MRI contrast agent (to visualise the lipid nanoparticles during MRI). Mice then undergo - while still being anesthetized- an MRI session and ultrasound is applied to direct the lipid nanoparticles to the hippocampus of both hemispheres. After this procedure, the mice awake from the anesthesia and are returned to their homecage.

**Behaviour:** Two weeks after the MRI-ultrasound procedure, the animals will be tested for anxiety- and depression-like behaviour. The behavioural tests will be executed as follows, with 1-2 days breaks between them:

**Elevated plus maze test:** The mice are gently placed in a plus-shaped arena which has two closed arms and two open arms. Their behaviour is videotaped over a trial of 5 minutes, during which the time spent on the open arms is used as a parameter for anxiety (less time on open arm > more anxiety).

**Light/dark box test:** The mice are gently placed in the dark compartment of an apparatus consisting of light and dark compartments which are connected to each other by a central small door. Their behaviour is videotaped over a trial of 5 minutes, during which the latency to enter and time spent in the light compartment is used as a parameter for anxiety (increased latency > more anxiety).

**Object recognition test:** The mice are allowed to habituate to the test cage, explore two objects in the test cage for 7 min. Then the mice are taken out of the cage, and after a 4-24 hrs interval placed back in the cage for 7 min with one object shifted to another location. Increased exploration of the object at a new location is a measure for spatial memory.

**Social interaction test:** The mice are habituated to the social interaction cage, 2x 10 min, then socially isolated for 24 hrs and finally allowed to socially interact with an unfamiliar group matched conspecific for 15 min. A decrease in social interaction can be an indication of social anhedonia or social withdrawal. With group matched conspecific we mean that social interaction takes place between animals of the same sex and same genotype. The animals are marked by their tail to distinguish the two animals. We test pairs of animals, and both animals are experimental animals, and are thus scored. No stimulus animals are used

in social interaction tests, since social interaction is reciprocal and thus always dependent on the other animals. This makes it important that the partner has had similar experiences. The animals that we test in social interaction need to be unfamiliar to each other, because cage mates may be less interested to interact with each other. The unfamiliarity will be based on the fact that the animals will be housed in different cages.

*Phenotyper test:* The mice are individually housed in the Phenotyper homepage for 72 hours. In the Phenotyper the mice are supplied with food and water, and bedding consisting of sawdust, as well as a shelter. The behaviour is automatically videotaped 24/7, and will afterwards be analyzed using Ethovision software. We measure activity patterns during the light and dark phase. Increased activity during the light phase (when the animals are supposed to sleep) can be an indication of disturbed sleep.

*Sucrose consumption test:* In the Phenotyper cages the mice are provided with two bottles of water on day 1 and on day 2. On day three one of the bottles is replaced by a bottle containing a 2-4% sucrose solution (all mice receive the same concentration, the best concentration will be determined based on current ongoing experiments). A reduction in sucrose intake and the preference for the sucrose solution is indicative for anhedonia.

**Killing:** 1 hr after behavioural testing, the mice will be decapitated under light anaesthesia to measure BDNF mRNA (RT-q-PCR) and protein (Western blotting) levels in the hippocampus and adjacent brain regions.

We will test the following groups of mice:

1. SERT KO - Lipid nanoparticles with BDNF mRNA + microbubbles + ultrasound
2. SERT WT - Lipid nanoparticles with BDNF mRNA + microbubbles + ultrasound
3. SERT KO - Lipid nanoparticles with scrambled mRNA + microbubbles + ultrasound (gene delivery control)
4. SERT WT - Lipid nanoparticles with scrambled mRNA + microbubbles + ultrasound (gene delivery control)

The scrambled mRNA is included to compare the effect of the intervention (BDNF mRNA transfer to the hippocampus) to a control situation. Using the scrambled mRNA, all procedures are the same as for group 1 and 2, except for the absence of BDNF mRNA.

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

Data will be analyzed using three-way ANOVA using genotype, treatment, and sex as between-subjects factors. In order to constrain the number of animals required while still retaining enough power, the sample size in literature and an estimation of the effect size based on previous studies will be used to calculate the sample size using the program G\*Power in work protocols. This will be attuned with a biostatistician.

<b>B. The animals</b>							
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
	01	Own breeding (after import)	Adult	24	F	WT	Serotonin transporter knockout
	01	Own breeding (after import)	Adult	24	M	WT	Serotonin transporter knockout
	01	Own breeding (after import)	Adult	24	F	KO	Serotonin transporter knockout

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	01	Own breeding (after import)	Adult	24	M	KO	Serotonin transporter knockout

**Provide justifications for these choices**

**Species**

The main rodents used for biomedical research are rats and mice. We will use mice, because the ultrasound-MRI procedure will be established in mice in DAP1, allowing us to transfer the most effective procedure to DAP 2.

**Origin**

The mice will be obtained from The Jackson Laboratory. After import, we will continue with own breeding.

**Life stages**

We will use young adult mice (10-12 weeks old), as anxiety and depression are particularly seen in young adult individuals [1]. Moreover, the previous findings on serotonin transporter knockout mice and rats on which we build here have been obtained using young adult mice and rats (see references in PP).

**Reference:**

1. Barker, M. M., Beresford, B., Bland, M. & Fraser, L. K. Prevalence and incidence of anxiety and depression among children, adolescents, and young adults with life-limiting conditions: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 173, 835–844 (2019).

**Number**

In a previous study applying a comparable test battery in serotonin transporter knockout animals, we used N=10-12 animals per group [1]. We will therefore use N=12 mice per group.

We will need in total for DAP2:  $N=12 \times 4 \text{ (groups)} \times 2 \text{ (sex)} = 96$  mice.

**Reference**

Olivier JD, Van Der Hart MG, Van Swelm RP, Dederen PJ, Homberg JR, Cremers T, Deen PM, Cuppen E, Cools AR, Ellenbroek BA. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience.* 2008 Mar 27;152(3):573-84.

**Gender**

Anxiety and depression have a female preponderance in humans [1]. Furthermore, there are slight differences in stress-related behaviour in serotonin transporter KO rodents [2, 3]. Therefore, we deem it important to test both male and female mice.

**References**

1. Altemus, M., Sarvaiya, N. & Epperson, C. N. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 320–330 (2014)
2. Kolter JF, Hildenbrand MF, Popp S, Nauroth S, Bankmann J, Rother L, Waider J, Deckert J, Asan E, Jakob PM, Lesch KP, Schmitt-Böhrer A. [Serotonin transporter genotype modulates resting state and predator stress-induced amygdala perfusion in mice in a sex-dependent manner.](#) *PLoS One.* 2021 Feb 19;16(2):e0247311.
3. van den Hove DL, Jakob SB, Schraut KG, Kenis G, Schmitt AG, Kneitz S, Scholz CJ, Wiescholleck V, Ortega G, Prickaerts J, Steinbusch H, Lesch KP. [Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene environment interactions.](#) *PLoS One.* 2011;6(8):e22715.

**Genetic alterations**

We will use the serotonin transporter knockout mouse model with a C57BL/6J background (<https://www.jax.org/strain/008355>) to test the intervention. This mouse model is chosen because it exhibits low



BDNF levels in the hippocampus as well as anxiety- and depression-like behaviour and because the model has high translational value. That is, both the serotonin transporter knockout mouse model and the short-allele of the human serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) are associated with increased stress sensitivity [1] and risk for depression [1,2,4,5]. The mouse model and humans also share reduced BDNF expression [3]. My colleagues and others have reviewed the high evolutionary conservation of the function of the serotonin transporter, across species (human, monkey, mouse rat) [1,4, 5]. We test two genotypes, WT and KO. As the homozygous serotonin transporter knockout mice and rats phenotypically model the human 5-HTTLPR low activity short allelic variant best, we do not consider it useful to also test heterozygous animals.

**References:**

1. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE, Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry.* 2010 May;167(5):509-27.
2. Bleys D, Luyten P, Soenens B, Claes, S. Gene-environment interactions between stress and 5-HTTLPR in depression: A meta-analytic update. *J. Affect. Disord.* 226, 339–345 (2018).
3. Homberg JR et al. The serotonin–BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 43, 35–47 (2014).
4. Kalueff AV et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 373–386 (2010).
5. Homberg JR, van den Hove DL. The serotonin transporter gene and functional and pathological adaptation to environmental variation across the life span. *Prog Neurobiol.*99(2):117-27 (2012).”

**Strain**

We use serotonin transporter knockout mice on C57BL/6J background because this strain has been widely used in literature. This allows us to link our findings to those reported in literature.

**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.

The mice will be housed for 4 days in social isolation.

The animals are socially isolated for 3 days during the Phenotyper test. This is necessary to be able to track the behaviour of the animals; the system cannot reliably track two animals simultaneously. Plans are in the making to improve this in the near future. The animals are furthermore socially isolated for 24 hrs before the social interaction test. This is needed to trigger motivation to socially interact (because the animals are standard socially housed in the home cage). We cannot use the social isolation during the Phenotyper test as preparation for the social interaction test, because then one of the animals will be tested in a cage to which it is not habituated, creating 'unfairness' between the animals.

**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?

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

Social isolation could lead to aggression in (male) mice. Aggression is not expected among the serotonin transporter knockout mice, because they are less aggressive compared to wild-type mice [1]. While the mouse strain we selected is not known to be aggressive in response to social isolation [2], we still cannot fully exclude aggression in the male mice after social isolation. Therefore, we plan the Phenotyper test, for which the animals are socially isolated for 3 days, the last of the behavioural test battery. If aggression

would occur, the animals can be sacrificed without the cost of losing information from the other behavioural tests.

Beyond the 72 hrs + 24 hrs of social isolation no other adverse effects are expected. The injection takes place under anaesthesia. The animals will not experience pain. The behavioural tests are all associated with mild discomfort.

Serotonin transporter knockout is not associated with negative effects on health or well-being.

**Reference**

1. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 2002; 161(2): 160-7.
2. Puglisi-Allegra, S. & Cabib, S. The effect of age on two kinds of aggressive behavior in inbred strains of mice. *Dev. Psychobiol.* 1985; 18, 477-482.

Explain why these effects may emerge.

Social isolation is needed to: 1. track the behaviour of animals in a home cage environment (Phenotyper), and 2 to motivate the animals to socially interact

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

There are no possibilities to minimise the effects of social isolation.

**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.

General symptoms such as raised fur, hunched back, poor coat conditions, behavioural changes like lethargy and loss of body weight (>15%) relative to the standard growth curve are considered as humane endpoints, after which the animals should be euthanized.

Indicate the likely incidence.

<2%

**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).

All procedures are considered to be mild. We do not expect an accumulation of discomfort because of repeated behavioural testing.

The table below provides an overview of the handlings and the discomfort estimation:

Experiment	Handlings	Discomfort	Number of mice
1	1 x anesthesia; 1 x waking up from anesthesia. Under anesthesia: i.v. catheterization, MRI and ultrasound.	Mild	96
	Elevated plus maze test; 5 min exploration of novel environment	Mild	
	Dark-light box test; 5 min exploration of novel environment	Mild	
	Object recognition test; 2 x 7 min exploration of objects in open field	Mild	
	Social interaction test; 15 min social interaction after 24 hrs of social isolation	Mild	
	Phenotyper + sucrose consumption test; 3 days of isolation + choice between plain water and sucrose solution	Mild	
	Killing under anesthesia (decapitation or perfusion)	Mild	
		Total: 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

The purpose of this project is to decrease anxiety- and depression-related behaviours through increasing hippocampal BDNF levels using lipid nanoparticles targeting the blood-brain-barrier and loaded with BDNF mRNA and low intensity-pulsed focused ultrasound. It is not possible to use alternatives like brain organoids because they are not a complete brain with all key brain regions and obviously cannot "behave". It is also not possible to use animals of a lower level than rodents, because the hippocampus is studied in the context of anxiety and depression. To measure this, a model with sufficient brain complexity and behavioural capacities is needed. We choose the mouse because this species displays sufficient brain complexity and allows us to measure anxiety- and depression-like behaviour with relevance for humans.

#### Reduction

The number of animals we use is based on a group size reported in the literature for similar readouts and is the minimum we need for statistically valid results. The behavioural tests are conducted in the same mice, reducing the number of mice that are needed.

#### Refinement

An experienced and trained PhD student will handle the animals, preventing that the animals will experience stress when being picked up. This in turn increases the quality of the experiment and is expected to reduce variability in data between animals. The lipid nanoparticle+microbubble injection plus MRI and ultrasound are conducted under anaesthesia. The behavioural tests are associated with minimal discomfort and do not involve physical harm.

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.

### 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.

**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.

### 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.

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

Mouse brains are needed to study BDNF expression in the hippocampus and adjacent brain areas through RT-Q-PCR and western blot. We will apply these techniques as mentioned in section A of this DAP.

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

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

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

No > Describe the method of killing.

Decapitation under light anesthesia. Decapitation is needed to obtain fresh brain material for RT-Q-PCR and Western blotting. Anesthesia helps to reduce any stress the animals may experience prior to decapitation. Because the anesthesia will be light, we expect that the anesthesia will not affect mRNA and protein expression levels.

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

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

N/A

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD10300202215977 / 2022-0006
2. Titel van het project: Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound
3. Titel van de NTS: Het piloten van een nieuwe behandelmethode voor depressie in muizen: Getherapie gericht op een specifiek hersengebied middels ultrageluid
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 07-04-2022
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 12-04-2022 en 24-05-2022
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 19-04-2022 tot 17-05-2022 en van 30-05-2022 tot 08-06-2022
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 17-05-2022 en 08-06-2022
  - advies aan CCD: 24-06-2022
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
  - Datum vragen: 19-04-2022
  - Datum antwoorden: 17-05-2022
  - Gestelde vragen en antwoorden:

#### Project Proposal:

-3.1: U schrijft dat lipide nanodeeltjes zodanig aangepast kunnen worden dat zij de bloed-hersenbarrière targeten en, zo veronderstelt de commissie, de bloedhersenbarrière kunnen passeren op de plaats waar u deze tijdelijk opent met microbelletjes/-bubbles en gefocuste ultrasound. De commissie dient de haalbaarheid van die benadering te toetsen.

Zou u meer informatie willen geven over de deeltjes die u zult gebruiken, bijvoorbeeld over samenstelling, beschikbaarheid, specificiteit voor de bloed-hersenbarrière, en, indien voor handen, resultaten van (in vitro?) experimenten met deze deeltjes die bevestigen dat deze deeltjes fuseren met hersencellen?

*Antwoord: To prevent mRNA's premature degradation and facilitate its intracellular delivery following systemic administration, current mRNA therapeutics rely on lipid nanoparticle technology [1,2]. Lipid nanoparticles are <100 nm in diameter and consist of (phospho)lipids, polyethylene glycol-conjugated lipids and ionizable cationic lipids. Using ionizable amino lipids results in efficient mRNA encapsulation during Lipid nanoparticle production at low pH, ensures LNPs' neutral surface charge in the circulation at physiological pH, and promotes endosomal escape [3]. Lipid nanoparticles technology and ionizable cationic lipids [4, 5], such as ALC-031526 used for the BioNTech/Pfizer COVID-19 vaccine, were developed in Pieter Cullis' lab (University of British Columbia). Lipid nanoparticle technology was initially designed to avoid the immune system and deliver RNA to the liver following systemic administration [6, 7].*

*Lipid nanoparticles are typically composed of five components: ionizable cationic lipids, phospholipids, cholesterol, polyethylene glycol (PEG)-lipids and RNA. The ionizable lipid shape and acid-dissociation constant optimization dramatically improved LNP potency, thereby enabling clinical translation. Optimizing previous-generation lipids, such as DLin-DAP, improved the therapeutic index 8,000-fold. Another key component in determining LNP-mRNA transfection competency is the PEG-lipid, which was required to prevent aggregation during particle formation. However, PEG-lipids inhibited uptake into target cells and were therefore counter-productive for transfection. To find an optimal balance between stability and transfection competency, diffusible PEG-lipids containing C14 alkyl chains were developed. In the presence of a lipid sink, these lipids rapidly dissociate from the LNP, generating transfection-competent systems.*

██  
██  
██

*Lipid nanoparticles do not cross the blood-brain-barrier. This has now been removed from section 3.1. However, in this project we aim to open the blood-brain-barrier at the level of the hippocampus through the combination of microbubbles and ultrasound. This we can only test in vivo, because we cannot apply the procedure to an in vitro cell or blood-brain-barrier system. This is done in DAP1, experiment 4. If this experiment fails, subsequent experiments will not take place (go/no go decision point).*

#### *References*

- 1. Kulkarni JA et al. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. Nucleic Acid Ther. 28, 146–157 (2018).*
- 2. Hou X, Zaks T, Langer R & Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat. Rev. Mater. 2021 1–17 (2021). doi:10.1038/s41578-021-00358-0.*
- 3. Kulkarni JA, Cullis PR & van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. Nucleic Acid Ther. 28, 146–157 (2018).*
- 4. Semple SC et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. Nat Biotechnol 28, 172–176 (2010).*
- 5. Jayaraman M et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. Chem Int Ed Engl 51, 8529–8533 (2012).*
- 6. Kulkarni JA et al. Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics. Acc. Chem. Res. 52, (2019).*
- 7. Witzigmann D, Kulkarni JA, Leung J, Chen S, Cullis PR, van der Meel R. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. Advanced Drug Delivery Reviews 159, 344–363 (2020).*

-3.1: Welk BDNF-mRNA (dus coderend voor welke variant?) zult u gebruiken? Zijn er perifere effecten van de BDNF-mRNA-nanodeeltjes in andere delen van het lichaam te verwachten?

*Antwoord: Previous work showed that overexpression of exon IV in the hippocampus in serotonin transporter knockout rats rescued anxiety- and depression-like behaviour [1]. Therefore, I will focus on exon IV mRNA levels.*

*BDNF is indeed found in the peripheral system. BDNF binds to the TrkB receptor. Rather than describing the locations of the TrkB receptor in the peripheral system and making interpretations out of this for the proposed intervention I refer to work of my colleagues who already have tested the effect of peripherally administered BDNF on brain and behaviour [2]. In the study of Verheij et al. the TrkB antagonist cyclotraxin-B was fused to the nontoxic transduction domain of the tat protein from human immunodeficiency virus type 1 (tat-cyclotraxin-B) to cross the blood-brain-barriers. No peripheral effects were observed. Other studies have used liposomes (another type of nanocarrier) to successfully bring BDNF from the periphery over the blood-brain-barriers [3-5]. No health effects are reported.*

*References:*

- 1. Diniz DM, Calabrese F, Brivio P, Riva MA, Grandjean J, Homberg JR. BDNF Overexpression in the Ventral Hippocampus Promotes Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activity in Serotonin Transporter Knockout Rats. *Int J Mol Sci*, 22(9), 5040 (2021).*
- 2. Verheij MM, Vendruscolo LF, Caffino L, Giannotti G, Cazorla M, Fumagalli F, Riva MA, Homberg JR, Koob GF, Contet C. Systemic Delivery of a Brain-Penetrant TrkB Antagonist Reduces Cocaine Self-Administration and Normalizes TrkB Signaling in the Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex. *J Neurosci*. 36(31), 8149-59 (2016).*
- 3. Arora S, Kanekiyo T, Singh J. Functionalized nanoparticles for brain targeted BDNF gene therapy to rescue Alzheimer's disease pathology in transgenic mouse model. *Int J Biol Macromol*. 208, 901-911 (2022).*
- 4. Lin C-Y, Lin Y-C, Huang C-Y, Wu S-R, Chen C-M, Liu H-L. Ultrasound-responsive neurotrophic factor-loaded microbubble- liposome complex: Preclinical investigation for Parkinson's disease treatment. *J Control Release*. 321, 519-528 (2020).*
- 5. Xing Y, Wen C, Li S-T, Xia Z-X. Non-viral liposome-mediated transfer of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neural Regen Res*. 11(4), 617-22 (2016).*

-3.1: Zou u meer achtergrondinformatie willen geven over de werking van de microbelletjes/microbubbles, en welk effect de ultrageluidbehandeling kan hebben (in verband met de gedragsexperimenten die erop volgen) op hersencellen?

*Antwoord: Ultrasound in the 0.3-3 Mhz range allows sending localized ultrasound waves through the skull with a precise focal area. The ultrasound waves cause cavitations in the microbubbles in suspension in the blood stream at the focal area (but not elsewhere). These cavitations cause the microbubbles to expand and contract, physically causing the blood-brain barrier in the capillaries to temporarily and reversibly loosen. This allows small molecules (but not larger elements such as red blood cells) to reach areas of the brain that are usually inaccessible behind the blood-brain barrier [1].*

*The modulation of brain activity with focused ultrasound is documented [2]. There, ultrasound waves are shown to act on mechanical receptors in the brain and cause changes in neuron excitability. This is however achieved with a different stimulation protocol (power, frequency, duration) that will not be applied in the proposed experiments. If residual neuromodulation is achieved presently, it has been shown to be limited in time, lasting only up to 2h post stimulation. Our primary outcome with BDNF overexpression occurs at a*



completely different timescale (days to weeks). Because the protocol is not designed to achieve a neuromodulation effect, it is not mentioned in the PP.

References:

1. Papachristodoulou A, Signorell RD, Werner B, et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. *J Control Release*. 295, 130-139 (2019)
2. Verhagen L, Gallea C, Folloni D, et al. Offline impact of transcranial focused ultrasound on cortical activation in primates. *Elife*. 8, e40541 (2019).

-3.3.1: Er is aangekruist dat het een basaal wetenschappelijk project betreft. Toch wordt het wetenschappelijk belang minder belicht dan het maatschappelijk belang (het belang voor patiënten). Zou u het wetenschappelijke belang uitgebreider willen beschrijven, en ook bij 3.3.2 het belang van de wetenschappelijke gemeenschap preciezer willen omschrijven?

*Antwoord: The rationale for this study is driven by the clinical situation: BDNF is key in depression, but in humans we cannot inject BDNF into the brain as we can in animals. This urges us to find a solution, and for that solution we start with animals. We propose a pilot (DAP 1) and validation (DAP 2) study, to initiate research on a new therapeutic route for psychiatric disorders. Many more preclinical steps are needed before societal impact is in reach. For instance, about the long-term effects of the intervention, how often should the intervention be repeated, is the intervention transferrable to other animal species and therefore generalizable? There are many follow-up questions, which we will not address here because we first need to show that the proposed intervention works. If the procedure already fails during the piloting, all the follow-up questions have been raised for nothing (NB: we have two go/no go steps included, one between step 3 and 4 of the pilot, and one between DAP1 and DAP2). Please note further that our section in 3.3.1 about societal relevance is called "Towards societal relevance", and thus describes the path we see that would be needed to reach societal impact. This section is merely about further preclinical steps that need to be taken before societal impact can be reached. Hence, we do not claim direct societal impact.*

*If the pilot and validation of the procedure are successful, then we can consider this project a success, as it will introduce a potential new therapeutic approach to treat brain disorders, which can trigger various preclinical follow-up experiments and extend to e.g. long-term effects, other molecules, other diseases, other animal models, etc.*

-3.3.1, maatschappelijke relevantie: Hoe zou een behandeling van patiënten eruit zien? Zijn er dan meerdere behandelsessies nodig (vanwege het in de loop van de tijd afnemen van de expressie)? De nanodeeltjes worden nu uitgetest in een klinische trial met kankerpatiënten, hetgeen mogelijk consequenties heeft voor het behandelingschema (één of enkele behandelingen) en het accepteren van bijwerkingen.

*Antwoord: This is an interesting question that is impossible to answer because this project only includes a pilot (DAP1) and validation (DAP2) part. Only if these two parts are successful, we can speculate about follow-up experiments that need to be carried out in animals before enough data are gathered to consider making the step towards clinical therapeutic modalities. It is not useful to already have a plan for the patient if we do not know if the intervention will work. We have mentioned in section 3.1 (context) that this work is funded by a high risk/high gain project from the Dutch Research Council. Hence, there is risk of failure (covered by clear go/no steps; see section 3.4). But if the project is successful, we will have a novel and unique intervention approach available to be explored further via preclinical studies.*

-3.4: Zou u willen toelichten welke gedragsverandering u verwacht door de geïnduceerde tijdelijke expressie van BDNF in (een deel van) één hippocampus? Uit de figuren leidt de commissie af dat u een unilaterale behandeling van de hippocampus beoogt, maar dit is niet duidelijk beschreven en onderbouwd in de verschillende onderdelen van het project (strategiebeschrijving, beschrijving van de dierproeven in de bijlage). Ook is niet onderbouwd waarom u ervoor heeft gekozen om BDNF-mRNA, eiwit niveaus, en het gedrag 2 weken na de ultrageluidbehandeling te testen. Bovendien is niet goed navolgbaar waarom een testbatterij van zes gedragsexperimenten noodzakelijk is om een gedragsverandering, door (unilaterale?) BDNF-expressie in de hippocampus, te kunnen meten. Zou u deze onderbouwingen willen toevoegen?

*Antwoord: In DAP1, experiment 4, we focus on one hemisphere, and in DAP2 we focus on both hemispheres. The reason for this difference is that in DAP1 we can use the not treated hemisphere as control, reducing the number of animals that are needed for piloting. In DAP2 we treat both hemispheres, because indeed targeting one hemisphere may not be sufficient to change behaviour. We expect that the increased expression of BDNF rescues the anxiety- and depression-like behaviour of the serotonin transporter knockout mice. I already have demonstrated this with local BDNF infusion into the hippocampus of serotonin transporter knockout rats (Diniz et al. 2020; ref 20), as mentioned in section 3.1*

*We had mentioned in section 3.1: "Furthermore, we have recently demonstrated that viral-mediated up-regulation of the BDNF gene in the hippocampus of the serotonin transporter knockout rat model leads to a reduction in anxiety- and depression-like behaviour [20]. In this study, BDNF mRNA levels remained elevated for at least 4 weeks, providing sufficient time to conduct behavioural tests. This provides us a strong basis to test the efficacy of the MRI-guided ultrasound targeting of the lipid nanoparticles with BDNF to the hippocampus and test its effects on behaviour". In this study [20] we observed BDNF upregulation two weeks after intra-hippocampus BDNF plasmid injection. We have chosen to evaluate the effect of the ultrasound treatment on BDNF upregulation and anxiety- and depression-like behaviour after two weeks, because translation of mRNA to protein needs time. After this 2-week time point, the BDNF levels remained elevated for at least another two weeks. This provides us a window of two weeks to conduct the behavioural tests.*

*For objective 2 / DAP2 we have mentioned in the text: "We use a test battery, because depression consists of a constellation of symptoms (anxiety, social withdrawal, cognitive deficits, disturbed sleep/wake patterns, anhedonia)". This is the reason. Depression is not one phenomenon, but is associated with changes in all the behavioural domains. Hence, one test will not be informative. This is especially the case as none of the measures are specific for depression (NB: psychiatric disorders are not black-and-white phenomena but consist of a series of symptoms that partially overlap with other disorders). If we would for instance measure only anxiety, it does not tell us much about depression, because anxiety is also seen in anxiety-related disorders, compulsivity disorders, autism, etc.*

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

\*DAP1

-A: Kunt u uitleggen wat elastografie is, en waarom dit een relevante primaire uitkomstparameter is?

*Antwoord: Elastography is an imaging method used with Magnetic Resonance Imaging to detect small changes in the tissue in response to the ultrasound. This allows us to see where the ultrasound focus is, and therefore guide the ultrasound to the area of interest.*

-A: U kiest ervoor om de gemeten hoeveelheid BDNF (mRNA en eiwit) in de behandelde hippocampus te relateren aan de hoeveelheid BDNF in off-target regio's (waar onder de amygdala). Zult u dit ook relateren aan de hoeveelheid BDNF in de niet-behandelde

hippocampus? In DAP2 gebruikt u nanodeeltjes met 'onzin'-mRNA als controle. Zou dat hier ook relevant kunnen zijn?

*Antwoord: Yes, we will measure BDNF levels in the hippocampus and amygdala of both hemispheres. We can only use nonsense mRNA when adding extra animals to compare with. This is not our intention, because that will increase the number of animals, and that is not really needed for this pilot, when comparing hemispheres to each other.*

-A: Kunt u tijdlijnen toevoegen, zodat duidelijker wordt wat de dieren in de verschillende experimenten (experiment 1 t/m 4) ondergaan?

*Antwoord: The timelines have been added to section A of DAP1.*

-A3: De commissie verzoekt u deze tekst te herzien. Zij neemt aan dat een statistische berekening onderdeel uitmaakt van de beoordeling van uw resultaten, ook als die dichotoom zijn, op basis waarvan u besluit dat de methode geschikt is. Bovendien ontbreekt nu een onderbouwing van de gehanteerde groeps groottes (10 dieren in experiment 1, 2, en 4, en 5 dieren in experiment 3) die worden aangevraagd. Kunt u kwantificeren wanneer de methode geschikt geacht wordt, zowel wat betreft de beslissing om experiment 4 uit te voeren, als de beslissing om DAP2 uit te voeren?

*Antwoord: We have revised the statistics methods to reflect the fact that we do not apply statistics, as this consists of a method implementation. The group size is determined based on personal prior experience with a similar project [1] and existing in-house experience with the equipment. This is further potentiated by the fact that for most critical points of the method implementation, we are re-using animals. We have added these considerations in the relevant section of DAP1.*

*Reference:*

*[1] Papachristodoulou A, Signorell RD, Werner B, et al. Chemotherapy sensitization of glioblastoma by focused ultrasound-mediated delivery of therapeutic liposomes. J Control Release. 295, 130-139 (2019).*

-B: Zou u kritisch willen kijken naar de noodzaak om zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor alle experimenten van dit basaal wetenschappelijk onderzoek?

*Antwoord: We test males and females because there can be differences in blood-brain-barrier principles between the sexes. We have no basis to assume that there are no differences between males and females. In DAP2 we test males and females because depression has a female preponderance, but also males develop depression. If we use only males for piloting, and then apply the procedure to both males and females in DAP2 and encounter unexpected issues, we have a challenge; we will not know whether we are looking at sex differences or technical issues because the procedure was not adjusted to sex. Testing males and females fits with the strong call from the biomedical sector as well as CCD to test both males and females. In the whole biomedical world, the male focus has led to limited understanding of the female body and this is a big problem, because half of the population is female. Thus, although we indeed need twice as many animals when testing both sexes, to avoid the male bias in biomedical research we think it is better to use both sexes for piloting*

-D: Een beschrijving per experiment zal waarschijnlijk meer inzicht geven in het optreden van pijn en andere welzijnsaantastingen bij de dieren.

Experiment	Handlings	Discomfort	Number of mice
1	8 x anesthesia; 7 waking up from anesthesia Under anesthesia: MRI + ultrasound. Killing during anesthesia	Moderate	20

2	4 x anesthesia, 3 times waking up from anesthesia. Under anesthesia: i.v. catheterization, MRI + ultrasound. Killing during anesthesia	Moderate	20
3	1 x anesthesia; Under anesthesia: i.v. catheterization, MRI and ultrasound. Killing during anesthesia	Non-recovery	30
4	1 x anesthesia; 1 x waking up from anesthesia. Under anesthesia: i.v. catheterization, MRI and ultrasound. Killing after pentobarbital induced anesthesia or by decapitation under light anesthesia	Mild	40

*The table has been added to section F of DAP1.*

-E: De commissie verzoekt u concreter te omschrijven (kwantificeren) wanneer een dier een humaan eindpunt bereikt.

*Antwoord: Since MRI and ultrasound are non-invasive methods, also applied in humans, we do not expect health issues. We have therefore inserted in the proposal the general human endpoints. Maybe it is meant that the first and second sentence are not optimally aligned, and that 'a combination of' is unclear. We removed the first sentence and 'a combination of' in both DAP1 and DAP2:*

-F: De commissie verzoekt u de beschrijving van het ongerief en de inschatting van het cumulatief ongerief voor de dieren te relateren aan de beschrijving van de handelingen van de dieren (per experiment, zoals in de gevraagde tijdlijnen) bij A.

*Antwoord: See the table given in response to point D.*

\*DAP2

-A: Zou u een tijdlijn willen toevoegen, zodat duidelijker wordt wat de dieren ondergaan?

*Antwoord: A timeline has now been added to section A.2.*

-A: De commissie verzoekt u uitgebreider te omschrijven hoe de sociale interactietest plaatsvindt. Betreft het muizen van hetzelfde geslacht, en wordt het gedrag van beide dieren geobserveerd, of gebruikt u hiervoor deels andere dieren (die geen onderdeel van deze aanvraag zijn)?

*Antwoord: Our short description is: "allowed to socially interact with an unfamiliar group matched conspecific for 15 min". With group matched conspecific we mean that social interaction takes place between animals of the same sex and same genotype. The animals are marked by their tail to distinguish the two animals. We test pairs of animals, and both animals are experimental animals, and are thus scored. No stimulus animals are used in social interaction tests, since social interaction is reciprocal and thus always dependent on the other animals. This makes it important that the partner has had similar experiences. The animals that we test in social interaction need to be unfamiliar to each other, because cage mates may be less interested to interact with each other. The unfamiliarity will be based on the fact that the animals will be housed in different cages. With N=12 mice per group we will have at least 3 different cages per group.*

-B: Is er een vergunning nodig voor de fok van deze dieren?

*Antwoord: No, it is a mouse line without discomfort*

**Niet-technische samenvatting:**

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

*Antwoord: We have transferred changes in the DAP to the NTS.*

- De titel loopt erg vooruit op de toepassing in de praktijk. Zou u dit willen aanpassen, zodat het beter aansluit bij de projectbeschrijving?

*Antwoord: We have changed the title to: Het piloten van een nieuwe behandelmethodede voor depressie in muizen: Gen-therapie gericht op een specifiek hersengebied middels ultrasound*

- De commissie adviseert om nogmaals naar de Nederlandse tekst te kijken.

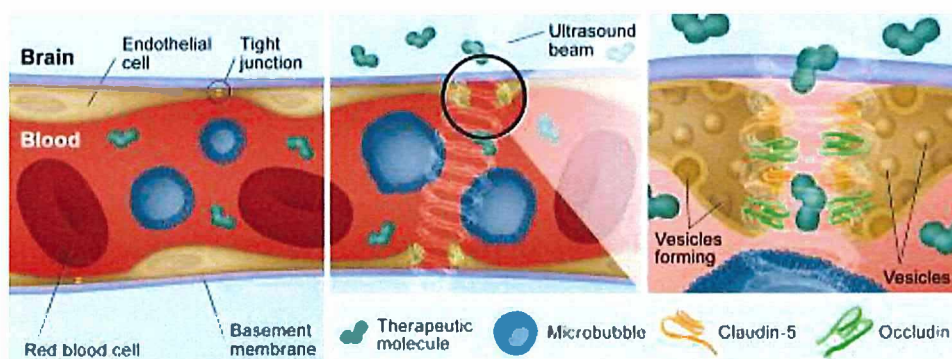
*Antwoord: We have simplified/changed some words. These are highlighted in dark orange.*

- Datum vragen: 30-05-2022
- Datum antwoorden: 08-06-2022
- Gestelde vragen en antwoorden:

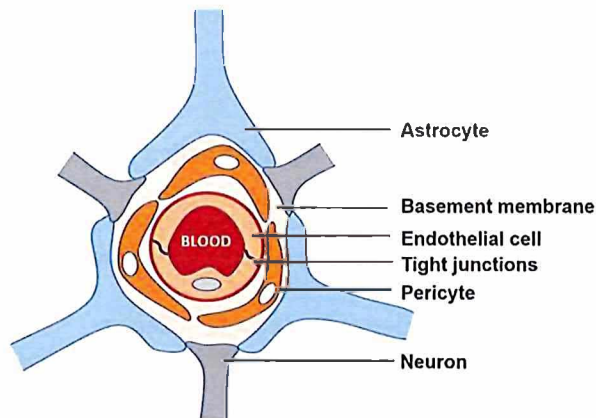
### Project Proposal:

-3.1: De commissie heeft verzocht om meer informatie die de haalbaarheid van de geschetste aanpak ondersteunen. De commissie kan de haalbaarheid, ondanks uw uitgebreide antwoord, nog steeds niet goed inschatten. De figuur die het doel van het onderzoek samenvat, laat zien dat de nanodeeltjes zullen fuseren met neuronen. Een lipide nanodeeltje dat zich in de bloedbaan bevindt moet meerdere hordes nemen (waar onder endotheelcellen met luminaal en abluminaal membranen, en gliacellen) voordat het kan fuseren met zenuwcellen in de hippocampus. De commissie gaat er van uit dat de ultrageluidbehandeling in combinatie met microvesicles vooral effect zal hebben op de eerste schil: endotheelcellen. In uw antwoordbrief noemt u kort dat de samenstelling van het lipide nanodeeltje bijdraagt aan ontsnapping uit endosomen (endosomal escape). Zou u duidelijker willen schetsen welke route het lipide nanodeeltje zal afleggen van bloedbaan tot neuron, en aangeven in hoeverre het lipide nanodeeltje ontworpen kan worden zodat het deze route zal volgen?

*Antwoord: Lipid nanoparticle–mRNA formulations can target many different tissues and cell systems in the body. The BBB consists of endothelial cells, pericytes, and the acellular basement membrane. The mechanical opening of the BBB through ultrasound in combination with microbubbles allows lipid nanoparticles to cross the basement membrane:*



Neuronal synapses contact the basement membrane:



When the particles have crossed the layers of the BBB, they thus encounter neurons. Once lipid nanoparticles reach the target cells, they can be internalized by multiple mechanisms, including clathrin-mediated endocytosis for which neurons have machinery [1]. Ionizable amino lipids (see answer to first rebuttal) facilitate the transfection of cells, including neurons [3]. Following cellular internalization, lipid nanoparticles are usually trapped in endosomal compartments. The usage of ionizable amino lipids promotes endosomal escape (see reply in first rebuttal), resulting in the leak of mRNA molecules into the cytoplasm. When in the cytoplasm, the mRNA can be used for protein synthesis via ribosomes.

There is literature evidence for lipid nanoparticle–mRNA formulations to be able to target neurons. When lipid nanoparticle mRNA formulations which cannot cross the BBB are doped into so-called neurotransmitter (NT)-derived lipids, the lipid nanoparticles can cross the BBB and enter neurons. However, this occurs in a non-targeted manner, so they end up at different locations in the brain [2]. Other examples of lipid nanoparticles being able to bring RNA to neurons can be found in ref 3 below. We collaborate with a researcher (see rebuttal 1; Roy van der Meel) who worked in the lab of one of the main authors from ref 3.

In sum, crossing the BBB is limiting factor (which we tackle here by ultrasound plus microbubbles), but not the entering of cells/neurons.

#### References

1. Hou X, Zaks T, Langer R et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* 6, 1078–1094 (2021).
2. Ma F et al. Neurotransmitter-derived lipidoids (NT-lipidoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection. *Sci. Adv.* 6, eabb4429 (2020).
3. Ravi L et al. Lipid Nanoparticle Delivery of siRNA to Silence Neuronal Gene Expression in the Brain. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Dec; 2(12): e136.

#### Description of Animal Procedures:

\*DAP1

-F: Het ongerief voor een deel van de dieren in experiment 3 van DAP1 is terminaal (gepresenteerd in de toegevoegde tabel). Deze dieren worden niet genoemd in de ongerieftabel van de NTS. Zou u deze gegevens in overeenstemming willen brengen met elkaar?

Antwoord: We updated the NTS.

#### Niet-technische samenvatting:

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: The answers to the questions do not lead to changes in the NTS text.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

1. Deze basaal wetenschappelijke aanvraag richt zich op de ontwikkeling van een methode om mRNA selectief in de cellen van de hippocampus af te geven om lokaal BDNF (brain derived neurotrophic factor) niveaus te verhogen. BDNF speelt een belangrijke rol in stress-gerelateerde aandoeningen en depressie. Recent is aangetoond dat het verhogen van BDNF-niveaus in de hippocampus van ratten, met behulp van een virale vector, leidt tot afname van depressie- en angst-gerelateerd gedrag bij deze dieren. In deze aanvraag staat de ontwikkeling van een andere methode (mogelijk bruikbaar bij patiënten) voor specifieke lokale afgifte in de hippocampus van lipide nanodeeltjes met BDNF-mRNA centraal. De lipide nanodeeltjes worden zodanig ontworpen dat zij specificiteit hebben voor de bloedhersenbarrière. Na toediening van zogenaamde microbelletjes via de staartvene, wordt met behulp van lokaal toegediend laag-energetisch ultrageluid, onder geleide van MRI-beelden, de bloed-hersenbarrière (BBB) gedurende korte tijd (6-24 uur) geopend op de plaats waar de nanodeeltjes deze zouden moeten passeren, zodat de nanodeeltjes en het BDNF-mRNA in hersencellen terecht komen. De toepassing van laag-energetisch ultrageluid om de BBB te openen is gebaseerd op het feit dat de microbelletjes onder invloed van het ultrageluid opzwellen en samentrekken, hetgeen er toe leidt dat de BB zich ter plaatse tijdelijk opent. Dit is al eerder onderzocht en, onder bepaalde voorwaarden, veilig gebleken. Deze methode wordt onder andere gebruikt in een klinische studie voor de behandeling van hersentumoren bij kinderen. In deze aanvraag wordt de ultrageluidprocedure getest in vier stappen om te controleren of de procedure geen weefselschade geeft en, indien bewezen veilig (go / no go beslissing), leidt tot BDNF-expressie in de hippocampus. Bij veelbelovende resultaten wordt de methode gevalideerd in een muismodel voor angststoornis en depressie (serotonine transporter knockout) waarbij het angst- en depressie-gerelateerde gedrag van de dieren wordt getest twee weken na de behandeling met BDNF mRNA bevattende nanodeeltjes. De commissie constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende stappen volgen logisch op elkaar, en geven uiteindelijk een indicatie van de bruikbaarheid van deze methode voor lokale expressie van BDNF in de hippocampus van muizen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria hij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen “tegenstrijdige” wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is de ontwikkeling van een methode (lipide nanodeeltjes-MRI-ultrageluid) om BDNF niveaus selectief in de hippocampus te verhogen zonder verhoging in andere hersengebieden, en te valideren dat dit leidt tot afname van angst- en depressie-gerelateerd gedrag in een relevant muismodel. Het uiteindelijke doel is bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor stress-gerelateerde en andere psychiatrische stoornissen op basis van deze methode (lipide nanodeeltjes-MRI-ultrageluid). De opening van de bloedhersenbarrière met behulp van microbelletjes en lokaal toegepast ultrageluid is al eerder onderzocht in diermodellen, en wordt op dit moment in een klinische studie voor de behandeling van hersentumoren bij kinderen onderzocht. Deze methode zou, wanneer de veiligheid is bevestigd in klinische studies, derhalve mogelijk bij mensen met een (stress-gerelateerde) psychiatrische stoornis gebruikt kunnen worden. Er is daarom binnen deze aanvraag een directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de veiligheid en de effectiviteit van deze nieuwe behandelingsmethode nog zeer beperkt zijn, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen op basis van lipide nanodeeltjes-MRI-ultrageluid, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen voor (stress-gerelateerde) psychiatrische aandoeningen. De huidige behandeling voor depressie leidt pas na meerdere weken tot een verlichting van klachten. Bovendien blijkt dan pas dat deze behandeling niet effectief is bij 30-40% van de patiënten. Specifieke expressie van bewezen effectieve stoffen in bepaalde hersengebieden zou kunnen leiden tot een snellere en effectievere behandeling van mensen met (stress-gerelateerde) psychiatrische aandoeningen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. Na vragen van de commissie heeft de onderzoeker uitgelegd waarom hij verwacht dat het openen van de bloedhersenbarrière de belangrijkste (en feitelijk enige) horde is die genomen moet worden voordat de specifiek ontworpen nanodeeltjes hun inhoud (BDNF-mRNA) kunnen afleveren in het cytosol van neuronen. De commissie kan nog steeds niet goed inschatten in hoeverre de geschetste aanpak zal leiden tot goede expressie van BDNF in neuronen in de hippocampus. De onderzoeker werkt samen met collega's die veel expertise hebben in het design van lipide nanodeeltjes, waardoor het aannemelijk is dat de nanodeeltjes zo goed mogelijk worden ontworpen om te leiden tot BDNF-expressie in de juiste cel(organel)len. Het betreft een zogenaamd 'high-risk high-gain' project, dat in elk geval zicht zal geven op de eventueel te overwinnen obstakels. De commissie is van mening dat dit op zich al van voldoende belang is om deze experimenten te rechtvaardigen. De helder beschreven go / no go beslissingen zullen voorkomen dat er onnodig dieren gebruikt zullen worden.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke



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

Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan het beschikbaar komen van een unieke methode om de expressie van eiwitten in bepaalde hersengebieden te manipuleren. Dit opent nieuwe wegen voor (pre)klinisch onderzoek naar hersenaandoeningen.

Voor patiënten met een angststoornis of een depressie is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor hun ziekte. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een effectievere behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor (stress-gerelateerde) psychiatrische aandoeningen, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de bewering van de aanvrager dat er geen nadelige effecten voor het milieu te verwachten zijn, in twijfel te trekken.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met gedragsstudies en beeldvormende technieken bij muizen, en ervaring met de overige voor dit onderzoek benodigde technieken. De lipide nanodeeltjes worden geproduceerd door een samenwerkingspartner in hetzelfde instituut, die hier zeer veel ervaring mee heeft. Het onderzoek van de aanvrager heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan (zie C1 en C4). Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

10. In de aanvraag wordt, om redenen die samenhangen met de proefopzet, afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): Tijdens de Phenotyper test, die drie dagen duurt, zijn de dieren individueel gehuisvest, omdat het systeem niet in staat is om twee dieren simultaan te volgen. Voorafgaand aan de sociale interactie test worden de dieren 24 uur individueel gehuisvest, om de motivatie tot sociale interactie te vergroten. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing zijn om gedurende enkele goed omschreven kortdurende periodes de dieren individueel te huisvesten. De overige tijd worden de dieren in groepen gehuisvest.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het (herhaald) bijkomen uit anesthesie (noodzakelijk voor de MRI en de toediening van ultrageluid), de i.p. injectie, de gedragstesten, en kortdurende individuele huisvesting. Het cumulatieve ongerief voor dieren die meerdere keren bijkomen uit anesthesie is ingeschat als matig. Voor de overige dieren is het cumulatieve ongerief ingeschat op licht. Deze inschattingen zijn navolgbaar en volgen logisch uit de beschreven handelingen.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven. Het betreft onder meer genetisch gewijzigde dieren, waarbij de serotonine-huishouding is verstoord (serotonine transporter knockouts). Deze genetische wijziging is niet geassocieerd met negatieve effecten op gezondheid en welzijn van de dieren. De dieren ondergaan een procedure onder anesthesie, waardoor bij een deel van de dieren BDNF-niveaus in een bepaald hersengebied toenemen. Deze dieren zouden hierdoor ander gedrag kunnen gaan vertonen.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat een humaan eindpunt zal bereiken is naar verwachting zeer laag en op basis van eigen ervaring en gegevens uit de wetenschappelijke literatuur ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor het onderzoek is het van belang dat de bloedhersenbarrière intact is, waardoor het niet mogelijk is om hersenorganoïden te gebruiken. Het onderzoek kan niet met mensen worden uitgevoerd, omdat veiligheid en effectiviteit van de methode eerst uitgetest moeten worden in proefdieren.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit pilots worden gebruikt voor het design van vervolggewijze experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Het is niet bekend of de bloedhersenbarrière verschillend reageert in vrouwen en mannen. Het is

daarom belangrijk om de ultrageluidprocedure zowel in vrouwelijke als mannelijke dieren te testen. Bovendien zijn er kleine sexe-gerelateerde verschillen in stress-gerelateerd gedrag in serotonine transporter KO muizen gerapporteerd. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het voor dit basaal wetenschappelijke onderzoek noodzakelijk is om de proeven zowel met vrouwelijke als mannelijke dieren uit te voeren.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De meeste handelingen worden onder anesthesie uitgevoerd. De gekozen gedragstesten veroorzaken relatief weinig ongerief voor de dieren. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om het effect van de procedure op hersenweefsel (schade en BDNF-expressie) te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen dieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.  
*NTS*

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

#### **D. Ethische afweging**

1. Rechtvaardigt het belang van de ontwikkeling van een methode (lipide nanodeeltjes-MRI-ultrageluid) om BDNF niveaus selectief in de hippocampus te verhogen zonder verhoging in andere hersengebieden, en te valideren dat dit leidt tot afname van angst- en depressie-gerelateerd gedrag in een relevant muismodel, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een matige (voor 40 dieren), lichte (voor 136 dieren) of terminale (voor 30 dieren) aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).

Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot het beschikbaar komen van een unieke methode om de expressie van eiwitten in geselecteerde hersengebieden te manipuleren. Dit opent nieuwe wegen voor (pre)klinisch onderzoek naar hersenaandoeningen.

Voor patiënten met een angststoornis of een depressie is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor hun ziekte. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. De huidige beschikbare behandelingen voor depressie zijn slechts bij een deel van de patiënten effectief, en een effect treedt doorgaans pas op na

verloop van meerdere weken. De resultaten van dit project kunnen mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie met een nieuwe toedieningsroute (liposomen met mRNA in combinatie met ultrageluid) voor deze mensen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor depressie van substantieel belang. Het eenvoudig kunnen passeren van de bloedhersenbarrière is ook voor andere medicatie van belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: de ontwikkeling van een methode (lipide nanodeeltjes-MRI-ultrageluid) om BDNF niveaus selectief in de hippocampus te verhogen zonder verhoging in andere hersengebieden, en te valideren dat dit leidt tot afname van angst- en depressie-gerelateerd gedrag in een relevant muismodel. Het uiteindelijke doel daarvan is bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor angststoornissen en depressie op basis van deze methode. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Van: info@zbo-ccd.nl  
Verzonden: vrijdag 1 juli 2022 15:57  
Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn  
CC: [REDACTED] Postbus DierExperimenten Commissie  
Onderwerp: Aanhouden AVD10300202215977

Geachte [REDACTED]

Op 07-04-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound " met aanvraagnummer AVD10300202215977. 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:

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is vandaag in de CCD vergadering besproken. Daarbij werd opgemerkt dat uw aanvraag naast een fundamenteel karakter ook een translationeel karakter heeft. Kunt u daarom in de niet-technische samenvatting en het projectvoorstel aankruisen dat het zowel fundamenteel als translationeel onderzoek betreft? Kunt u daarnaast in de bijlagen, onder B, ook ingaan op de translationele waarde van het door u gebruikte muis model?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]  
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.

4 Juli, Nijmegen

Betreft: AVD10300202215977 (reactie op gestelde vragen 1 juli 2022)

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven (CCD),

Hartelijk dank voor het beoordelen van aanvraag AVD10300202215977. Middels deze brief geven wij U een antwoord op de gestelde vragen.

Met vriendelijke groet,



Aankruisen in niet technische samenvatting en projectvoorstel dat de aanvraag zowel een fundamenteel als translationeel karakter heeft.

**Antwoord:** Zowel het vakje betreffende fundamenteel als ook het vakje betreffende translationeel karakter zijn nu aangekruist in zowel het projectvoorstel als ook in de niet technische samenvatting.

Uitleg waarom de serotonine transporter knockout rat een translationeel model is in bijlage B van DAP2.

**Antwoord:** De hieronder volgende tekst staat in de originele tekst in bijlage B van DAP2 onder het kopje genetic alterations: *"We will use the serotonin transporter knockout mouse model with a C57BL/6J background (<https://www.jax.org/strain/008355>) to test the intervention. This mouse model is chosen because it exhibits low BDNF levels in the hippocampus as well as anxiety- and depression-like behaviour (see PP). We test two genotypes, WT and KO. We and others have previously demonstrated that serotonin transporter knockout mice and rats model the human 5-HTTLPR low activity short allelic variant (see PP). Therefore, we do not consider it useful to also test heterozygous animal"*. Het muizen model is translationeel omdat het model staat voor de korte (short; s) allel van de serotonine transporter linked polymorphic region (5-HTTLPR) in de mens. De s-allele gaat gepaard met minder serotonine transporter productie. Vele studies hebben aangetoond dat het gedrag en hersenfunctie van de homozygote serotonine transporter knockout muis overeenkomt met bevindingen bij menselijke dragers van het 5-HTTLPR korte allel. We hebben de informatie uit de PP hier toegevoegd, als volgt: *"We will use the serotonin transporter knockout mouse model with a C57BL/6J background (<https://www.jax.org/strain/008355>) to test the intervention. This mouse model is chosen because it exhibits low BDNF levels in the hippocampus as well as anxiety- and depression-like behaviour and because the model has high translational value. That is, both the serotonin transporter knockout mouse model and the short-allele of the human serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) are associated with increased stress sensitivity [1] and risk for depression [1,2,4,5]. The mouse model and humans also share reduced BDNF expression [3]. My colleagues and others have reviewed the high evolutionary conservation of the function of the serotonin transporter, across species (human, monkey, mouse rat) [1,4, 5]. We test two genotypes, WT and KO. As the homozygous serotonin*

*transporter knockout mice and rats phenotypically model the human 5-HTTLPR low activity short allelic variant best, we do not consider it useful to also test heterozygous animals.*

**References:**

1. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE, Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry.* 2010 May;167(5):509-27.
2. Bleys D, Luyten P, Soenens B, Claes, S. Gene-environment interactions between stress and 5-HTTLPR in depression: A meta-analytic update. *J. Affect. Disord.* 226, 339–345 (2018).
3. Homberg JR et al. The serotonin–BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 43, 35–47 (2014).
4. Kalueff AV et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 373–386 (2010).
5. Homberg JR, van den Hove DL. The serotonin transporter gene and functional and pathological adaptation to environmental variation across the life span. *Prog Neurobiol.*99(2):117-27 (2012).”



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD10300202215977  
**Bijlagen**  
3

Datum 8 juli 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 april 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound " met aanvraagnummer AVD10300202215977. 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 8 juli 2022 tot en met 31 mei 2027.

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

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 24 juni 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.



#### *Nadere vragen aanvrager*

Op 1 juli 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het toevoegen van translationeel onderzoek als projectcategorie en het onderbouwen van de translationele waarde van het muismodel. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**  
8 juli 2022  
**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202215977

#### **Overwegingen**

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

#### **Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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

**Meer informatie**

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

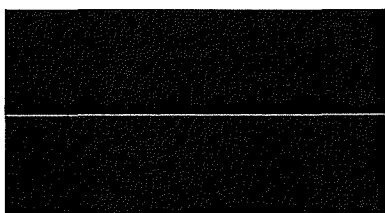
**Datum:**

8 juli 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD10300202215977

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Postbus 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juli 2022 tot en met 31 mei 2027, voor het project "Brain-region specific gene delivery in the treatment of depression: Guiding lipid nanoparticles to their target using Low intensity-pulsed focused ultrasound " met aanvraagnummer AVD10300202215977, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent professor CNS. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 7 april 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 juli 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. Pilot, zoals ontvangen op 7 juli 2022;
    - 3.4.3.2. Behaviour, zoals ontvangen op 7 juli 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 7 juli 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 juni 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 7 juli 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. Pilot</b>			
	Muizen (Mus musculus)	110	27,3% Terminaal 36,4% Matig 36,3% Licht
<b>3.4.3.2. Behaviour</b>			
	Muizen (Mus musculus) / 48 wildtype muizen en 48 serotonine transporter KO muizen	96	100,0% Licht

### 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

**Aanvraagnummer:** AVD10300202215977

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:**  
AVD10300202215977

## 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 verdooving**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202215977

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.

De NTS van dit project staat gepubliceerd op de website van de EU:

<https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/web/resources/alures/submission/nts/list>

U kunt de NTS het makkelijkste vinden door op de Nederlandse titel te zoeken. De samenvattingen op deze website hebben een Europees volgnummer welke verschilt van het Nederlandse NTS-nummer. Voor meer informatie over de NTS en een lijst met zowel de Nederlandse als Europese volgnummers gaat u naar deze pagina op de website van de CCD:

<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/themas/niet-technische-samenvattingen>

The NTS of this project is published on the website of the EU and can be found here:

<https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/web/resources/alures/submission/nts/list>

The easiest way to find the NTS is to search on the Dutch title. The summaries on this website are indicated with their European serial number, which is different from the Dutch NTS number.

You can find more information about the NTS and a list with the Dutch NTS numbers and their corresponding European counterparts on the website of the CCD:

<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/themas/niet-technische-samenvattingen>