

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
nr.	document NTS2016749	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
9	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	

13 JAN. 2017



Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD401002016749

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemer nummer in 40100 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Stichting Wageningen Research</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9098104</td><td></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	9098104							
Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	9098104																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos</td><td>12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>59</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6700AB</td><td>Wageningen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL10RABO0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Wageningen UR</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12	Postbus	59		Postcode en plaats	6700AB	Wageningen	IBAN	NL10RABO0397066465		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12															
Postbus	59																
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen															
IBAN	NL10RABO0397066465																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2017 |
| Einddatum | 01 - 12 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Lang leve de gezonde melkkoe
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van een monitoring- en management tool om de gezondheid van de Nederlandse melkkoe te meten en te verbeteren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC WUR |
| Postadres | ██████████ 6700 WB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning Euro 1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Bestelorder WUR1023898
- Appendix description animal procedures

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]	
Functie	[Redacted]	
Plaats	Wageningen	[Redacted]
Datum	03 - 01 - 201	[Redacted]
Handtekening	[Redacted]	



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'. 40100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Wageningen Research
- 1.3 Provide the title of the project. Lang leve de gezonde melkkoe

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The transition period is a critical phase in the life of dairy cows. The transition period is marked by changes in endocrine status to prepare parturition and lacto-genesis and is defined as the period between 3 weeks pre-partum until 3 weeks post-partum [1].

It is a demanding period for dairy cows which makes them vulnerable for the development of metabolic and infectious diseases [2]. Especially in the first weeks after calving, cows experience a high incidence of diseases and metabolic disorders, such as hypocalcaemia, hypomagnesaemia, ketosis as well as retained placenta, displacement of the abomasum, metritis and laminitis [3]. Metabolic stress occurs when cows fail to adapt physiologically to an increase in nutrient requirements needed for parturition and milk synthesis and secretion. This metabolic stress causes health disorders together with dysfunctional inflammatory responses and the experienced oxidative stress [4].

Great progress has been made in understanding the biology of energy metabolism and immune function as well as how to provide the behavioural and nutritional needs of transition dairy cows [5]. Also epidemiological studies have revealed critical risk factors for these diseases. Based on this knowledge, often generic veterinary herd health management programs have been developed to shift from curative to preventive health management [6]. Although successes have been achieved in diminishing incidences of milk fever, clinical respiratory diseases in adults, the incidence of most common and important diseases remain stable [5]. According to LeBlanc 30%-50% of dairy cows are affected by some sort of metabolic or infectious disease around the time of calving [7]. Apparently cows still have difficulties in adapting to all changes and disturbances occurring inside and outside the animal during the transition period. This high incidence of peri-parturient disorders [4] results in high culling rates reducing the longevity of dairy cows.

Transition management should therefore be improved to better meet the demands of the cows themselves, staying within their adaptive capacity boundaries.

Herd health management often focusses on solutions at group level. Production or age groups within dairy herds are exposed to the same feeding and housing conditions despite the fact that individual cows can vary considerably in their needs, due to differences in weight, milk yield, age, social rank, etc. The ability to cope with metabolic stress also varies considerably between individual cows [8]. So there is individual variation between animals in their adaptive capacity and this variation can be further influenced by environmental, management, feeding, housing factors.

The many possible causes that contribute to development of metabolic disorders and the large variation in management between farms indicate that transition management should always be analysed within its specific (farm) context. The most limiting factors that contribute to the overstressed ability of all present animals to adapt to their living conditions are the key factors that needs to be improved. It is clear that animals within a herd will be better able to adapt in order to survive, if appropriate resources and living conditions are offered which meet the individual requirements are the different stages of their lives and if nutritional and other disturbances are reduced to a minimum [4].

This requires continuous and comprehensive monitoring of appropriate indicators reflecting the adaptive capacity of cows together with farm management analysis indicating the crucial risk and critical success factors at farm level. At this moment there are no indicators that identify cows at risk for developing transition period related disorders. Management programs would especially benefit if early identification of individual cows at risk for disease is embedded. This would allow for early intervention and optimization of the transition period at individual level. Providing the behavioural needs and room to obtain the nutritional needs for all animals within a herd, would improve adaptive capacity of all animals, and thus

diminishing health problems.

In the previous project [REDACTED] we already examined the risk to develop diseases early in the lactation period. In this project we modelled the relationship between [REDACTED]

[REDACTED] recorded in individual cows before calving with the score of post-partum clinical disturbances. Simultaneously we performed farm analysis to indicate critical success and risk factors to suggest modes of improvement at individual farm level.

The first results from this project showed indeed relations between [REDACTED]

[REDACTED] To further validate these preliminary results and to develop algorithms that can be used in management programs, the experiment should be performed on different farms, with a larger number of animals. The [REDACTED] data to predict the vulnerability will be collected with [REDACTED]. Also expiration air will be measured with a device fixed in the concentrate boxes of the farms. The [REDACTED] will be calculated with this respiration device and related to the risk of developing ketosis. To calculate the score of diminished health, clinical exams are performed and blood samples are taken to measure (golden standard) values. To detect (sub)clinical ketosis, linking with the [REDACTED] in a number of cows more frequent blood sampling is necessary in addition to the blood sampling to calculate the days of diminished health. Simultaneously farm analysis will be performed (with KoeKompas) to collect the crucial limiting factors. Management adaptations that should improve the limiting factors (obtained from KoeKompas), can then be evaluated by the positive effect on the number of vulnerable animals.

References:

1. Grummer RR (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of animal science* 73: 2820-2833.
2. Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, Von Keyserlingk MAG (2007) Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science* 90: 3220-3233.
3. Urton G, von Keyserlingk MAG, Weary DM (2005) Feeding Behavior Identifies Dairy Cows at Risk for Metritis. *Journal of Dairy Science* 88: 2843-2849.
4. Sundrum A (2015) Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. *Animals* 5: 978-1020.
5. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE (2006) Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: 1267-1279.
6. Derks M, van Werven T, Hogeveen H, Kremer WDJ (2013) Veterinary herd health management programs on dairy farms in the Netherlands: Use, Execution, And relations to farmer characteristics. *Journal of Dairy Science* 96: 1623-1637.
7. LeBlanc SJ (2014) Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal* 8: 54-63.
8. Kessel S, Stroehl M, Meyer HHD, Hiss S, Sauerwein H, et al. (2008) Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *Journal of Animal Science* 86: 2903-2912.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objective of this project is to validate and develop a predictive management tool that detects vulnerable cows during the dry period, before illness occurs. This early identification of individual cows allow the farmers to adapt management strategy, to adjust it according the needs and adaptive capacity of individual cows. This means a shift of focus from optimizing or even maximizing production towards maximizing health and welfare within livestock production systems. This will reduce the use of medications such as antibiotics and will improve longevity of dairy cows.

In contrast to methods which are directed at early identification of disease or illness, this project aims to develop indicators for resilience that can be embedded in management tools to improve the resilience of dairy cows and increase the capability to stay healthy during the critical transition phase they encounter.

3.3 Relevance

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

Reduction of the use of antibiotics as well as improvement of longevity within dairy productions systems, are both subjects of societal as well as scientific concern. There is a growing need to adapt management of livestock to meet the needs of the animals, instead of adapting the animals to fit in the husbandry systems. The latter has led to vulnerable animals which are no longer able to adapt to the challenges they encounter. Effective customized management and housing strategies focussing on the needs of the animals at specific farms, can help to keep animals healthy under changing circumstances.

3.4 Research strategy

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

In this project experiments are performed on dairy farms as is explained above, specific farm context is crucial in developing custom made management tools. The project is divided in 3 work packages, in which the first two animal experiments are involved. The third work packages uses the datasets from the 2 first work packages to develop a management tool that can be used on farms.

1. Validating of indicators of diminished resilience of dairy cows during transition period.
2. Measuring breath analysis as indicator for ketosis in dairy cows during the transition period.
3. Developing management tool (no animal experiment needed)

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

1. Validating of indicators of diminished resilience of dairy cows during transition period. Animal experiments on 5 different farms where [REDACTED] with the use of (non-invasive) sensors, attached to the cow [REDACTED]. These continuous measurements [REDACTED]. To validate the preliminary results of phase 1 of this project. The patterns will be related to a days of diminished health score. This score is based on clinical examinations performed by a veterinarian and the blood values of [REDACTED]. These blood values are established golden standard values to evaluate clinical status of cows. The cows will be followed from 3-2 weeks before expected parturition day, until 6 weeks after calving. The cows will be clinically examined 2 times per week. Blood sampling will occur once during the dry period, once in the first week after calving and once in the fifth week after calving. The farms will be inspected based on the established Koekompas score system which is

the official score system used by the dairy sector in which critical success factors and risk factors are revealed.

Per farm a number of cows are followed varying between 20-60 cows, depending on the size of the farm and the calving peak during the measuring period.

2. Measuring breath analysis as early indicator for (sub)clinical ketosis in dairy cows during the transition period. Ketosis is an important metabolic disorder occurring during the transition phase when feed intake does not match the required needs during this phase for the growth of the calf and milk production after calving. Also often sub(clinical) ketosis occurs, which is more difficult to detect. Ketosis can be diagnosed by taking blood or urine. Breath analysis could be used as non-invasive alternative already during the dry period as a predictor for (sub)clinical ketosis before clinical symptoms become overt. For this analysis the same farms are used as in work package 1. The clinical examinations are used, as well as the blood sampling. To link the breath analysis to the ketosis, more frequently blood sampling is needed. At 2 farms the breath analysing method will be installed and linked to the golden standard of blood sampling. More frequent blood sampling is needed to especially also detect (sub)clinical ketosis.

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

Work package 1 and 2 use the same experimental set up and the same measurements are used for the analysis. Only on 2 farms extra blood sampling is needed to validate the breath analysing technique with the current golden standard. Work package 3 uses the data that are obtained and requires no extra animal experiment.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Validating indicators of resilience of dairy cows
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	40100	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Wageningen Research	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	Validating indicators of resilience of dairy cows

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Om tot relevante indicatoren te komen, welke in de melkveepraktijk gebruikt kunnen worden om het risico om ziek te worden te verlagen, is het nodig om het onderzoek ook in de melkveepraktijk te laten plaatsvinden. Het vroegtijdig detecteren van een verhoogde kwetsbaarheid van koeien, nog voordat er sprake is van ziek zijn, maakt het bijsturen middels management aanpassingen mogelijk, waardoor ziekte kan worden voorkomen. Globale indicatoren zijn voortgekomen uit een eerder experiment en deze dienen op grotere schaal te worden gevalideerd om zo tot een voorspellend model te komen. De validatie dient onder praktijkomstandigheden plaats te vinden. Ook het effect van (management) veranderingen op melkveebedrijven kunnen daardoor gevolgd worden.

Op 5 verschillende melkveebedrijven worden gedurende verschillende maanden koeien gevolgd in de transitiefase. Deze periode loopt van 2-3 weken voor het afkalven, tot minimaal 6 weken na het kalven. In totaal worden 250 koeien gevolgd, verdeeld over deze 5 bedrijven en per bedrijf kan het aantal variëren tussen de 20 of 60, afhankelijk van bedrijfsgrootte en spreiding van ziektegevallen.. De koeien worden voorzien van sensoren (stappentellers, herkauwmeters) welke continu hoogfrequente metingen vastleggen. De koeien worden gedurende de periode door een dierenarts klinische gescoord. Hierdoor krijgt iedere koe een klinische score gedurende de periode na het afkalven.

Aspecten van de hoogfrequente metingen welke zijn verzameld voor het afkalven, worden gerelateerd aan de klinische scores na het afkalven. Om deze klinische score nauwkeuriger vast te leggen, worden bloedmonsters genomen (welke tevens als gouden standaard dienen). Per koe wordt gedurende de meetperiode 3 keer een bloedmonster genomen.

In de krachtvoerboxen op twee van deze bedrijven wordt een sensor ingebouwd die uitademingslucht van koeien kan meten. De Respiratie exchange Ratio (RER) kan uit deze uitademingslucht berekend worden ieder keer dat de koe de krachtvoerbox bezoekt. Een verandering in patroon van RER kan duiden op een

omslag in metabolisme wat tot ketose kan leiden. Om deze meting te valideren wordt bij de koeien op 2 bedrijven binnen deze proef, extra bloedmonsters genomen. Om met name ook zicht te krijgen op de subklinische ketosen, zijn frequentere metingen nodig. Met een frequentie van 2x per week kunnen zo kortdurende pieken in de ketonlichamen in het bloed (gedurende 2 of 3 dagen) ook gedetecteerd worden. Over de periode van 8 weken, wordt van deze koeien 15x een bloedmonster genomen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Het klinisch onderzoek wordt eenmalig tijdens de droogstand verricht en 2x per week na het kalven. Dit bestaat uit het beoordelen van ademhaling, herkauwen, pensinhoud, uier, lichaamsconditie, kreupelheid en algehele conditie. Daarnaast wordt rectaal de temperatuur gemeten en de koeien worden rectaal opgevoeld om de baarmoeder te beoordelen na het kalven.

Er wordt per koe gedurende de onderzoeksperiode 3 maal een bloedmonster uit de staart genomen, één keer tijdens de droogstand. Twee keer na het kalven (de eerste keer in de eerste week na het kalven, de tweede keer tussen de vierde en zesde week na het kalven). Er worden maximaal 1 buisje van 10 ml per keer afgenomen per koe.

Op de bedrijven waar ook de validatie van de uitademingslucht wordt verricht, wordt per koe gedurende de onderzoeksperiode 2 keer per week een bloedmonster uit de staart genomen. Voor deze bepaling is slechts 1 druppel bloed per keer voldoende. Er wordt hiervoor per koe maximaal 15 keer een bloedmonster genomen gedurende 8 weken. Het betreft in totaal maximaal 50 koeien.

Het klinisch onderzoek en de bloedafname wordt door dierenartsen uitgevoerd. Hoewel voor de bepaling van ketonlichamen in het bloed slechts één druppel bloed nodig is, wordt toch gekozen om bloed uit de staart te nemen, aangezien dit bij de koeien als meest snelle en minst pijnlijke methode wordt ingeschat.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

De statistische onderbouwing is afkomstig uit een eerdere proef met 22 koeien. Van deze koeien was het totaal aantal 'days of diminished health' (DDH) berekend aan de hand van klinische waarnemingen en bloedwaardes. Op dit bedrijf (uit de vorige proef) waren de days of diminished health goed verspreid. Dat wil zeggen, er waren 6 koeien met minder dan 7 DDH, 7 koeien met een DDH tussen de 7-14 en 9 koeien met een DDH boven de 20.

Bij een bedrijf met minder klinische waarneembare problemen, zal deze verdeling anders liggen en zal het nodig zijn om meer koeien te volgen om toch voldoende spreiding in de DDH te krijgen (voldoende koeien met minimale problemen én voldoende koeien met problemen). Op een bedrijf met een zeer lage klinische incidentie is ingeschat dat er 60 koeien gevolgd moeten worden om minimaal 7 dieren met een DDH score van boven de 20 te krijgen, naast voldoende gezonde dieren. Op een probleem bedrijf wordt ingeschat dat er minimaal 50 koeien gevolgd moeten worden om voldoende dieren met een score van <7 DDH te krijgen. Hier komt de maximale totaal aantal berekende koeien van 250 (50 dieren per bedrijf, met een spreiding van 20-50 koeien) vandaan. Er moet rekening gehouden worden met een groot 'bedrijfseffect' en daardoor zullen van alle bedrijven voldoende koeien meegenomen moeten worden. Indien voldoende aantallen gedurende het onderzoek zijn bereikt, kan het aantal beperkt worden tot een minimum aantal koeien.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Koeien zijn afkomstig van Nederlandse melkveebedrijven. Totaal aantal dieren gedurende het hele project 250 dieren. De dieren blijven na het experiment gewoon op het bedrijf. De koeien zijn in de leeftijd tussen 2 en 10 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

De dieren welke op Dairy Campus worden gebruikt in deze proef kunnen in de toekomst voor ander onderzoek gebruikt worden. De enige handeling welke wordt verricht bij de dieren gedurende deze proef, zal geen blijvende gevolgen hebben voor de dieren. Van de dieren afkomstig van de overige melkveebedrijven, is het niet waarschijnlijk dat zij nogmaals voor een dierproef gebruikt zullen worden.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging van deze proef door een proef met een dierproefvrij model is niet mogelijk, omdat dit onderzoek is gericht op het meten van de veerkracht van individuele koeien en het aanpassen van houderij omstandigheden om de veerkracht van de koeien te verhogen en ziekte te voorkomen. Daartoe is het noodzakelijk om waarnemingen te doen aan de dieren onder praktijk omstandigheden. Dit kan niet gedaan kunnen worden in een dierproefvrij model

Om tot een betrouwbare voorspelling te komen en dit te kunnen valideren in de praktijk, is een praktijkproef op grote schaal nodig. Door de grote variatie tussen bedrijven en tussen koeien, zijn grote aantallen nodig. Door het gebruik van niet invasieve sensoren, welke vaak al op bedrijven aanwezig zijn, wordt het ongerief zo veel mogelijk beperkt. Dit experiment kan alleen bij de daarvoor bestemde diersoort worden uitgevoerd en moet op praktijkbedrijven worden uitgevoerd om te kunnen valideren. Het ongerief is beperkt tot het 3 maal bloedmonsters nemen uit de staart. Dit kan zoveel mogelijk gecombineerd worden met de standaard bedrijfsbezoeken van de dierenarts, waar vaak al bloedmonsters genomen worden voor het monitoren van de ziektestatus van het bedrijf. Het bloedmonster wordt uit de staart genomen, op het moment dat het dier gedurende korte tijd vast staat aan het voerhek. Aangezien het praktijkbedrijven betreft, is het niet mogelijk middelen te gebruiken om lokaal de staart niet invasief te verdoven met bijvoorbeeld zalf of spray. Deze middelen zijn niet geregistreerd voor het gebruik bij rundvee en mogen daarom in de praktijk niet worden toegepast. Het alternatief, om lokaal met een prik te verdoven is overwogen, alleen de handeling duurt daardoor langer en er moet dan in totaal twee keer geprikt worden, wat een extra belasting is. Door het goed fixeren van de staart en adequaat handelen kan de tijdsduur van de bloedafname tot een minimum beperkt worden.

Bij de bedrijven waar ook de ademanalyse wordt gedaan, wordt frequenter bloed afgenomen om ook de (sub)klinische ketose te kunnen detecteren. Dit betreft een deel van de dieren (maximaal 50). Omdat deze frequentere bloedafname noodzakelijk is om ook de subklinische ketose te detecteren, welke gemist wordt, wanneer er bijvoorbeeld 1x per week of nog minder frequent wordt bemonsterd, is ervoor gekozen dit bij een zo klein mogelijk aantal dieren

De voorgestelde aantallen zijn gebaseerd op eerder uitgevoerd onderzoek. Indien lopende het project op basis van de resultaten blijkt dat dit aantal verminderd kan worden (met inachtneming van het benodigde onderscheidend vermogen), wordt dit aantal verminderd.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Het bloed afnemen uit de staart is de meest gebruikte methode bij rundvee, welke het minste ongerief oplevert bij de koe. Door het optillen van de staart en het naar voren duwen van de staartwortel, wordt de prik door de koe nauwelijks ervaren en duurt de handeling zeer kort.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Een eerdere studie met in totaal 20 koeien is uitgevoerd. Deze studie dient op grotere schaal op meerdere bedrijven herhaald te worden om tot een gevalideerd model te komen. Het onderzoeksprotocol is op basis

van deze eerdere studie aangepast waardoor er minder metingen nodig zijn zowel klinische waarnemingen als bloedonderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De dieren worden gehuisvest volgens de Nederlandse normen voor melkvee

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

De proeven worden uitgevoerd op Nederlandse melkveebedrijven

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Deze proef kan alleen op praktijkbedrijven worden uitgevoerd omdat het een validatie betreft van een model dat in de melkveehouderij gebruikt gaat worden. De huisvesting en verzorging wordt door de veehouders verzorgd en behandeling van eventuele zieke dieren door de dierenartsen.

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het betreft een bloedafname uit de staart, dus een eenmalige kortdurende pijnsensatie. Een lokale verdoving is op praktijkbedrijven alleen mogelijk d.m.v. een injectie met lidocaïne. Dit betreft ook weer een injectie waardoor de handeling langer duurt en er twee keer moet worden geprikt. Er is ingeschat dat het lokaal verdoven op deze manier het kortdurende ongerief niet zal verzachten. Het toepassen van lokale niet invasieve verdoving is op praktijkbedrijven niet mogelijk, aangezien deze middelen niet voor die toepassingen bij rundvee zijn geregistreerd.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Indien dieren ziek worden, zullen deze conform de veterinaire norm worden behandeld

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ziekte kan optreden in de normale melkveehouderij. Dit zal niet het gevolg zijn van het onderzoek

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Er wordt zo min mogelijk ingegrepen in de dagelijkse routine van het melkveebedrijf. Naar verwachting zal het onderzoek geen invloed hebben op de normale gang van zaken van de bedrijven

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht ongerief bij de koeien die in totaal 3 maal een bloedmonster wordt afgenomen

Matig ongerief bij de koeien bij wie in totaal 15 maal een bloedmonster wordt afgenomen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project
"Lang leve de gezonde melkkoe"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002016749**
2. Titel van het project: Lang leve de gezonde melkkoe
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van een monitoring- en management tool om de gezondheid van de Nederlandse melkkoe te meten en te verbeteren
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 23-12-2013
Aanvraag compleet: 23-12-2013
In vergadering besproken: 16-01-2017
Termijnonderbreking(en) van / tot: 18-01-2017 tot 20-01-2015
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 18-01-2017
Gestelde vragen *en antwoorden*:
 - De DEC discussieert of het mogelijk is om predictieve tools te ontwikkelen als "iets" er nog niet is maar zich mogelijk in de toekomst kan ontwikkelen en komt tot de conclusie dat voorafgaand aan de klinische fase mogelijk een subklinische fase voorafgaat waarin al parameters meetbaar zijn. De DEC

Wageningen
University & Research

DATUM
24 januari 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002016

ONS KEIWERK
AVD401002016

POSTADRES
[REDACTED]

BEZOEKADRES
[REDACTED]

INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[REDACTED]

TELEFOON
[REDACTED]

E-MAIL
DEC@wur.nl

vraagt zich af of dit aan de hand van de voorgestelde uitleesparameters mogelijk is of dat er bijv. ook leverenzymen gemeten moeten worden.

- *Dit klopt, het is niet mogelijk om ziekte te detecteren die zich nog niet manifesteert. Het project richt zich op het aanwijzen van verminderde resilience, veerkracht, een fase waarbij het risico om ziek te worden verhoogd is. Dus nog voordat de ziekte klinisch of subklinisch aanwezig is. We gebruiken verschillende bloedparameters om de uiteindelijk klinisch geconstateerde ziektes preciezer te scoren. Daarbij gebruiken we met name de haptoglobine als 'early warning' in de subklinische fase. Uit de eerdere proef is gebleken dat dit haptoglobine inderdaad een paar dagen voordat we de koeien als klinisch ziek hebben gescoord al verhoogd was (bij metritis, mastitis, algeheel ziek). We maken gebruik van het standaard bloedwaardenpakket van de GD om problemen tijdens de droogstand en/of vroege lactatie op te sporen, hier worden leverenzymen niet meegenomen. Om hier extra leverenzymen aan toe te voegen zien wij niet als meerwaarde. Een verstoorde leverfunctie is het gevolg van de negatieve energiebalans. Deze verstoorde energiebalans willen we wel in het bloed laten bepalen.*
- De DEC merkt op dat de vraag in de bijlage onder C niet goed is beantwoord: het gaat niet om toekomstig gebruik maar om eerder gebruik.
Dit is aangepast. De dieren welke op het proefbedrijf worden gebruikt kunnen mogelijk in eerdere proeven zijn gebruikt. Pensfistelkoeien zullen in deze proef niet mee worden genomen omdat deze niet representatief zijn voor de Nederlands melkkoe. Er is ingeschat dat eerdere proeven met de dieren van het proefbedrijf geen blijvende gevolgen hebben gehad op de dieren. De dieren afkomstig van de overige melkveebedrijven, zijn niet eerder gebruikt als proefdier.
- Vermindering is in de ogen van de DEC niet mogelijk. De DEC discussieert of het mogelijk is om met 5 bedrijven, waarbij de tussen-bedrijf variatie groter is dan de binnen-bedrijf variatie, "HET" algoritme te ontwikkelen. Of worden de bedrijven juist zo divers en extreem gekozen dat daar wel 1 algoritme uit ontwikkeld kan worden dat breed inzetbaar is. De DEC is van mening dat het doel mogelijk te ambitieus is en ziet dit project meer als een aanzet tot het ontwikkelen van een algoritme.
Dit is een terechte opmerking. In feite ontwikkelen we via dit onderzoek een methode die geschikt is voor alleen de bedrijven waar we de koeien van hebben geselecteerd. De vertaalslag naar een veel groter aantal bedrijven willen we uiteindelijk in de vervolgfase doen, waarvan we dan uitgaan dat er geen bloedonderzoek meer nodig is, maar kan worden volstaan met niet invasieve metingen zoals normaal al gebruikt worden in de veehouderij (zoals de activiteit meters en vreet en herkauwsensoren).



DATUM
24 januari 2017

ONS KENMERK
AVD401002016

PAGINA
3 van 6

- Verdere verfijning dan in het project wordt beschreven is in de ogen van de DEC niet mogelijk. Eventueel kan worden overwogen om ketose te meten in de melk, echter, er wordt vaak standaard bloed afgenomen om de gezondheid van een kudde te monitoren. De DEC kan dan ook instemmen met het afnemen van bloed afnemen.
We hebben inderdaad uitgezocht of we melk konden gebruiken in de sneltest (precision ketonen test) in plaats van bloed. Dit bleek niet het geval, de sneltest is alleen gevalideerd voor bloedmonsters en er werd ingeschat dat het ook niet geschikt zou zijn om er melk in te meten. Er zijn wel ketotest strips (ketotest) voor de melk op de markt die alleen een globale inschatting geven van de ketonlichamen (laag- gemiddeld – hoog aan de hand van een kleurverschil). Deze zijn voor ons doel niet nauwkeurig genoeg.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het betreft een klein, langdurig project.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het linken van fysiologische en gedragsparameters aan de 'kwetsbaarheid' van de koe tijdens de transitieperiode.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het ontwikkelen van een algoritme waarbij de gedragsparameters ingevoerd kunnen worden waarmee koeien met een verhoogd risico gedetecteerd kunnen worden en er op individueel niveau (management)maatregelen

genomen kunnen worden. Het doel is niet om de productie te verhogen, maar de individuele gezondheid van het dier te monitoren en te verbeteren.

De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Doeldieren: verbeteren gezondheid
 - Veehouder: economisch belang
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Maatschappij: verbeterde diergezondheid
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel, waarin verwijzingen naar eerder onderzoek en regerenties gegeven worden en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het onderzoek is logisch en helder opgezet en meet vooral de 'agility' van de koe en de adem, af en toe ondersteund door bloedafnames. Deze parameters zijn noodzakelijk voor het opzetten van een database. Met deze database wordt het project uiteindelijk volbracht.

De DEC discussieert of het mogelijk is om predictieve tools te ontwikkelen als "iets" er nog niet is maar zich mogelijk in de toekomst kan ontwikkelen en komt tot de conclusie dat voorafgaand aan de klinische fase mogelijk een subklinische fase voorafgaat waarin al parameters meetbaar zijn.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren verblijven op praktijkbedrijven zowel binnen als buiten de instellingsvergunning. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd. De onderzoeker heeft in de ogen van de DEC voldoende onderbouwd dat het praktijkgericht onderzoek betreft en dat dit op praktijkbedrijven uitgevoerd moet worden.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De huisvesting en verzorging wordt door de veehouders verzorgd en behandeling van eventuele zieke dieren door de dierenartsen. Dat is de gangbare praktijk bij de bedrijven en wordt in het kader van de wet dieren door de Nederlandse overheid ook ondersteund.

11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: herhaalde bloedafname.
12. Naast ongerief is er geen van sprake van aantasting van integriteit van het dier.
13. De DEC heeft vastgesteld dat proefgerelateerde humane eindpunten in dit project niet aan de orde zijn.

DATUM
24 januari 2017

ONS KEUWMERK
AVD401002016

PAGINA
5 van 6

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Onder de huidige omstandigheden waarbij het houden van koeien maatschappelijk geaccepteerd is, is het onderzoek doen naar de individuele status van een koe alleen op deze manier mogelijk. Doel van het project is te komen tot zelfs een model, zodat voorspellingen aan het dier in de toekomst eventueel alleen aan de hand van enkele gegevens mogelijk is.
15. De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Eventueel kan worden overwogen om ketose te meten in de melk, echter, er wordt vaak standaard bloed afgenomen om de gezondheid van een kudde te monitoren. De DEC kan dan ook instemmen met het afnemen van bloed.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. Omdat melkgevende dieren gebruikt moeten worden is er sprake van alleen vrouwelijke dieren. Omdat het dieren uit de gangbare houderij betreft heeft dit geen surplusdieren tot gevolg.
19. De dieren blijven na het project in leven.

NTS

20. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centraal morele vraag is of het verzamelen van data om een model te ontwikkelen waarmee de gezondheid van de individuele koe kan worden gemonitord, zodanig, dat uiteindelijk hier op individueel niveau op geanticipeerd kan worden en de individuele gezondheid verbeterd kan worden opweegt tegen het driemaal bloed afnemen bij 250 koeien, met mild ongerief?
2. Bij de beoordeling van het doel heeft de DEC in overweging genomen dat als het project zijn uiteindelijke doel bereikt dit in het belang is van de doeldieren, veehouder, onderzoeker en maatschappij. Voor de doeldieren gaat het om de waarden van welzijn en gezondheid. De DEC acht het bevorderen van de gezondheid op individueel dierniveau van een matig belang, mede omdat et landelijk en ook wereldwijd om grote aantallen dieren gaat. Hierdoor is ook sprake van een reëel belang voor de veehouders. Het gaat hierbij voornamelijk om een economische waarde. Dit geldt

eveneens voor de onderzoekers/ CRO. Bij deze laatste speelt echter ook de waarde van kennis mee. Gezien het toegepaste karakter van het onderzoek schat de DEC dit in als gering. Ook de maatschappij en de consumenten zullen bij het behalen van het doel een gering voordeel hebben.

Tot slot zijn er waarden voor de proefdieren in het geding er is sprake zijn van een maximaal lichte welzijnsaantasting door herhaalde bloedafname voor 250 koeien. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.

3. De DEC heeft in haar afweging betrokken dat er sprake is van een project dat een samenhangend geheel betreft. Gezien de opzet is de DEC van mening dat het directe en uiteindelijke doel haalbaar zijn en dat dit onderzoek kan bijdragen aan de belangen en waarden zoals hierboven genoemd. De DEC heeft in de afweging expliciet stil gestaan bij de vraag of dit vraagstuk specifiek is voor een intensieve vorm van veehouderij. Zij is echter de conclusie gekomen dat dit in dit project niet van toepassing is omdat het onderzoek voor alle melkveehouderijsystemen relevant kan zijn. De DEC is van mening dat het doel en de daarmee verbonden waarden het maximaal lichte ongerief voor de proefdieren rechtvaardigen en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Met vriendelijke groet,


secretaris DEC WUR



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016749

Bijlagen

2

Datum 10 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 januari 2017. Het gaat om uw project "Lang leve de gezonde melkkoe". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002016749. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

10 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002016749

Datum:
10 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016749

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 9098104
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
10 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016749

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2017
Geplande einddatum: 1 december 2021
Titel project: Lang leve de gezonde melkkoe
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van een monitoring- en management tool om de gezondheid van de Nederlandse melkkoe te meten en te verbeteren
Naam DEC: DEC WUR
Postadres DEC: [REDACTED], 6700 WB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Wageningen
Datum: 3 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research Concernstaf+
T.a.v. crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016749
Bijlagen
2

Datum 10 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 januari 2017
Vervaldatum: 9 februari 2017
Factuurnummer: 170749
Ordernummer: WUR1023898

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002016749	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002016749

Datum 25 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 10 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Lang leve de gezonde melkkoe" met aanvraagnummer AVD401002016749. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de NTS geeft u aan dat het project de categorieën Fundamenteel onderzoek en Translationeel onderzoek betreft. In het Projectvoorstel geeft u aan dat het Translationeel onderzoek betreft. Welke categorieën voor het onderzoek houdt u aan? Indien dit anders is dan nu in de NTS aangegeven, wilt u dan een nieuwe NTS sturen waarin dit is aangepast?

In de NTS en het DEC-advies wordt gesproken over licht ongerief. In de Bijlage Dierproeven geeft u aan dat er sprake is van licht en matig ongerief. Wilt u aangeven welk ongerief u verwacht en dit aanpassen in de NTS of de Bijlage Dierproeven?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Datum:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002016749

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Wageningen Research

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD401002016749

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002016749

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Korte reactie op de gevraagde aanvullingen (aanvraag AVD401002016749)**Onduidelijkheden**

In de NTS geeft u aan dat het project de categorieën Fundamenteel onderzoek en Translationeel onderzoek betreft. In het Projectvoorstel geeft u aan dat het Translationeel onderzoek betreft. Welke categorieën voor het onderzoek houdt u aan? Indien dit anders is dan nu in de NTS aangegeven, wilt u dan een nieuwe NTS sturen waarin dit is aangepast?

Antwoord:

Het gaat hier om translationeel onderzoek en niet om fundamenteel onderzoek. De NTS is aangepast en de nieuwe versie wordt hierbij ingestuurd.

In de NTS en het DEC-advies wordt gesproken over licht ongerief. In de Bijlage Dierproeven geeft u aan dat er sprake is van licht en matig ongerief. Wilt u aangeven welk ongerief u verwacht en dit aanpassen in de NTS of de Bijlage Dierproeven?

Antwoord:

Het gaat om herhaaldelijk bloedonderzoek wat als licht ongerief is geclassificeerd, zoals ook door de DEC is aangegeven. Sorry voor de onduidelijkheid. De Bijlage dierproeven is aangepast en de nieuwe versie wordt hierbij opgestuurd.

Wageningen, 30 januari 2017

████████████████████



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002016749
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Lang leve de gezonde melkkoe" met aanvraagnummer AVD401002016749. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de categorie waarin het project valt en het ongerief.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Lang leve de gezonde melkkoe" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 1 december 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC WUR. Dit advies is opgesteld op 24 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden

aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016749

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

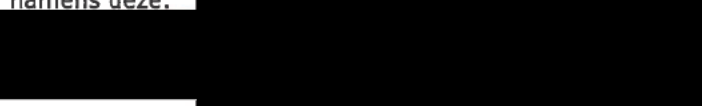
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Wageningen Research
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 februari 2017 tot en met 1 december 2021, voor het project "Lang leve de gezonde melkkoe" met aanvraagnummer AVD401002016749, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 januari 2017, ontvangen op 25 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Validating indicators of resilience of dairy cows				
	Runderen (Bos taurus) / melkkoeien	250	Licht	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Aanvraagnummer:
AVD401002016749

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD401002016749

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD401002016749

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS2016751	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
5	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek om nadere aanvulling CCD - email				x		x	x	
11	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
12	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD-email				x		x	x	
13	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > <i>Vul uw deelnemernummer in</i> 11557 <input type="checkbox"/> Nee > <i>U kunt geen aanvraag doen</i>															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	30244197									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	30244197																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn																
Postbus	12007																
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Associate Professor</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Associate Professor		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Associate Professor																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Post-doctoraal onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Post-doctoraal onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Post-doctoraal onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 12 - 2016
- Einddatum 1 - 12 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC Bureau van de DEC Utrecht
- Postadres Huispostnummer D01.343
Postbus 85500
3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

16-11-2016



Format Projectvoorstel dierproeven

- i. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- ii. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- iii. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- iv. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- i. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- ii. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- iii. Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Algemene introductie

Hersenschade in pasgeboren baby's is een zeer ernstig klinisch probleem met levenslange consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. In de kliniek onderscheiden we momenteel twee belangrijke patiëntengroepen op basis van hun ontwikkelingsfase: de voldragen baby's met acute hersenschade als gevolg van zuurstofgebrek bij de geboorte en de te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof hersenschade met of zonder focale laesies. Voor beide patiënten groepen zijn momenteel, naast acute hypothermie (koeling) voor voldragen baby's met ernstige acute hersenschade, geen therapieën beschikbaar. Onze aanvraag richt zich op het verrichten van wetenschappelijk en translationeel onderzoek naar het in kaart brengen van de pathofysiologie van deze typen hersenschade bij pasgeboren baby's en naar mogelijke nieuwe therapieën voor deze patiënt-doelgroepen.

Hersenschade bij het pasgeboren kind wordt in veel gevallen veroorzaakt door neonatale hypoxie-ischemie (HI). HI is een conditie van verlaagde zuurstofvoorziening (hypoxie) en doorbloeding (ischemie) in de organen, waaronder de hersenen. Door een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen (o.a. glucose), en een ophoping van afvalstoffen kan een HI insult in de hersenen weefselschade veroorzaken. Wereldwijd ondervinden 1.15 miljoen pasgeboren baby's (8.5 per 1000 levend geboren) een HI insult, wat in 25% leidt tot peri- of postnatale sterfte (jaarlijks 287.000 levend geboren). Van de pasgeboren baby's die het HI insult overleven ontwikkelt 35% permanente neurologische afwijkingen. Jaarlijks betreft dit naar schatting 414.000 pasgeboren baby's (1).

Het tekort aan zuurstof en glucose veroorzaakt verhoogde membraan depolarisatie en verstoorde ATP-afhankelijke glutamaat heropname vanuit de synapsspleet. Glutamaat excitotoxiciteit kan leiden tot celdood van neuronen (zenuwcellen) en oligodendrocyten (OGDs; gliacellen die myeline maken), onder andere via de productie van vrije radicalen zoals stikstofoxide. Deze cascade activeert tevens de andere gliacellen in de hersenen, t.w. microglia en astrocyten, wat leidt tot een inflammatoire respons op de plaats van het insult. Inflammatie, zowel in de hersenen als systemisch, veroorzaakt meer neuronale celdood en uiteindelijk meer weefselschade. De mate van permanente hersenschade na HI is afhankelijk van de ernst en de duur van het insult. Daarnaast is de pathogenese en klinische prognose afhankelijk van de locatie van de hersenschade en van het ontwikkelingsstadium van de hersenen (gestatie-leeftijd). De experimenten beschreven in **Bijlage I** van dit projectvoorstel hebben betrekking op zuurstofgebrek-(HI)-geïnduceerde hersenschade in zowel voldragen als te vroeg geboren baby's.

Onderzoek naar neuroprotectie (bescherming) en neuroregeneratie (herstel) van de pasgeboren hersenen heeft zich de afgelopen twee decennia met name gericht op de bovengenoemde zuurstofgebrek-(HI)-geïnduceerde hersenschade. Hoewel HI inderdaad een prominente oorzaak is van neonatale hersenschade, toont recent preklinisch (2) en klinisch (3) onderzoek aan dat perifere inflammatie een belangrijke (bijdragende) rol speelt bij het ontstaan van neuroinflammatie en daaropvolgende hersenschade. Inflammatie tijdens de zwangerschap (maternale inflammatie) zorgt voor immuun activatie in de uterus en vervolgens voor neuroinflammatie in de hersenen van het ongeboren kind. Maternale inflammatie is één van de belangrijkste oorzaken van vroeggeboorte. Deze te vroeg geboren baby's hebben vervolgens een groot risico op zuurstoftekort omdat de longen van de prematuur onvoldoende ontwikkeld zijn. De experimenten beschreven in **Bijlage II** van dit projectvoorstel hebben betrekking op hersenschade in te vroeg geboren baby's als gevolg van [REDACTED]

Doelgroepen voor onderzoek binnen deze projectaanvraag

In de afgelopen 15 jaar heeft [REDACTED] succesvol onderzoek gedaan naar het opzetten van klinisch-relevante/translationele diermodellen om hersenschade in de verschillende neonatale patiënt-doelgroepen na te bootsen, alsmede naar nieuwe behandelmethoden voor deze typen hersenschade.

Deze projectaanvraag betreft onderzoek naar neonatale hersenschade van **drie patiënt-doelgroepen**:

1. Voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie
2. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies
3. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie,

gekaracteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies

Pathologie van hersenschade in de drie doelgroepen

Doelgroep 1. Hersenschade in voldragen baby's

In voldragen pasgeboren baby's is hersenschade in de meeste gevallen het gevolg van acute asfyxie (verstikking) rondom of na de geboorte (perinataal of postnataal, resp.). Perinatale oorzaken omvatten afknelling van de navelstreng, placenta-loslating en placenta insufficiëntie. Postnatale oorzaken zijn ernstige ademhalingsproblemen, hartfalen, sepsis en shock. Perinatale HI in voldragen baby's leidt tot hersenschade in de grijze stof, omdat het celdood induceert van neuronen in breingebieden die gevoelig zijn voor zuurstoftekorten, zoals de basale ganglia, de thalamus en de hippocampus. Deze vorm van hersenschade wordt nagebootst in pasgeboren ratten of muizen door ze bloot te stellen aan HI tussen postnatale dag P7 en P9 (**Diermodel 1, Bijlage I**). Er is nauwkeurig in kaart gebracht dat tussen deze dagen de hersenontwikkeling van de knaagdieren te vergelijken is met een humaan voldragen brein (4). Deze HI hersenschade in de knaagdieren wordt gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuze laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Deze modellen worden al jarenlang wereldwijd en [REDACTED] gebruikt om therapieën te ontwikkelen voor deze groep patiënten [REDACTED]

Doelgroep 2 & 3. Hersenschade in te vroeg geboren baby's

Wanneer een schadelijk herseninsult vroeger in gestatie plaatsvindt wegens vroeggeboorte (meestal <32 weken gestatie-leeftijd; normale zwangerschapsduur is 40 weken), zorgt dit vooral voor (niet-cysteuze) schade in de witte stof. In deze witte stof ontwikkelen zich de zenuwuitlopers die verschillende hersengebieden met elkaar verbinden. Beschadiging van de witte stof heeft daarom ernstige consequenties voor aansturing van o.a. motoriek en cognitie. De zenuwuitlopers in de witte stof zijn omhuld met myeline, wat de uitlopers beschermt en signaaltransductie tussen neuronen versnelt. Het proces van myelinevorming rond zenuwuitlopers, ook wel myelinisatie genoemd, vindt plaats in de laatste weken van de zwangerschap en na de geboorte. Oligodendrocyten (OGDs) zijn de cellen in de hersenen die zenuwuitlopers voorzien van myeline. In de hersenen van te vroeg geboren baby's bevinden zich veel voorloper-OGDs, die gevoelig zijn voor inflammatie en zuurstoftekort. Inflammatie en zuurstoftekort zijn dan ook de twee grootste risicofactoren voor het ontstaan van witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's. Wanneer de voorloper-OGDs beschadigd raken door een inflammatoir en/of hypoxisch milieu, zullen deze cellen niet differentiëren tot volwassen OGDs, waardoor myelinisatie niet kan plaatsvinden. Dit leidt tot de karakteristieke witte stof hersenschade zoals wordt aangetroffen in de hersenen van te vroeg geboren baby's. Hoe het precies komt dat deze voorloper-OGDs niet differentiëren tot volwassen OGDs is echter grotendeels onbekend. Tevens is onbekend of de inflammatie en/of het hypoxisch milieu alleen zorgt voor differentiatie-arrest, of tevens zorgt voor celdood van voorloper-OGDs. Recente studies suggereren dat de andere gliale cellen (t.w. microglia en astrocyten) van het brein betrokken zijn bij het ontstaan van witte stof hersenschade, maar meer onderzoek is nodig om te ontrafelen hoe belangrijk deze cellen in de pathogenese van hersenschade in te vroeg geboren baby's zijn.

Er zijn vele vormen van witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's, maar recent onderzoek heeft aangewezen dat *niet-cysteuze diffuse witte stof schade* de belangrijkste en meest voorkomende vorm is. Niet-cysteuze diffuse witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan zowel *met* focale laesies (35% van de witte stof schade in te vroeg geboren baby's) als *zonder* focale laesies (57% van de witte stof schade in te vroeg geboren baby's) voorkomen. Voor deze beiden vormen van witte stof hersenschade hebben we een apart diermodel gevalideerd.

Niet-cysteuze diffuse witte stof schade *met* focale laesies (doelgroep 2) wordt nagebootst in muizen door ze bloot te stellen aan HI met inflammatie (d.m.v. lipopolysacchariden; LPS) tussen postnatale dag P4 en P6 (**Diermodel 2, Bijlage I**). Op deze dagen is de hersenontwikkeling te vergelijken met een humaan prematuur brein van 28-32 weken gestatie-leeftijd (4). De witte stof schade die wordt geïnduceerd komt overeen met de schade die kan worden waargenomen in te vroeg geboren baby's: de focale laesies in de witte stof zijn niet-cysteus, microglia en astrocyten zijn geactiveerd, er is verlies van voorloper-OGDs en myeline, en de ventrikels zijn vergroot (8,9).

Diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies (doelgroep 3) wordt geïnduceerd in ratten door

blootstelling aan systemische [redacted] gevolgd door [redacted] **Diermodel 3, Bijlage II**). De schade komt overeen met de typische diffuse vorm van witte stof hersenschade *zonder* focale laesies zoals tevens kan worden waargenomen in te vroeg geboren baby's: er is diffuse activatie van microglia en astrocyten, differentiatie arrest van voorloper-OGDs en verlies van myeline, en er zijn geen focale laesies waar te nemen [redacted]

Behandeling van neonatale hersenschade

Neonatale hersenschade ontwikkelt zich over een periode van weken na het daadwerkelijke insult, waardoor er mogelijkheden zijn voor therapeutische interventies. Helaas zijn deze tot op heden erg beperkt. Tot dusver is hypothermie, t.w. koeling van de hersenen of het gehele lichaam tot 33.5°C, de enige effectieve interventie voor het verlagen van mortaliteit en morbiditeit in voldragen baby's met hersenschade. De huidige hypothese suggereert dat celdood geremd wordt door het verlagen van het cellulaire metabolisme (aangezien minder zuurstofconsumptie leidt tot minder opstapeling van vrije radicalen). Hypothermie is alleen effectief bij voldragen baby's met perinatale asfyxie en matige tot ernstige hersenschade, mits de behandeling binnen 6 uur gestart wordt. Hypothermie kan vroeg de schade gedeeltelijk remmen, maar zorgt niet voor heropbouw van hersenweefsel. Er is daarom behoefte aan nieuwe behandelmethoden (al dan niet in combinatie met hypothermie).

Onderverdeling van de projectaanvraag

De behandelmethoden die we in deze projectaanvraag onderzoeken kunnen worden onderverdeeld in twee groepen: **1) neuroprotectie**, gericht op bescherming tegen vroege schade, of **2) neuroregeneratief**, gericht op herstel en heropbouw van neurale weefsel. De neuroprotectieve benadering omvat het remmen van A) celdood en B) neuroinflammatie relatief vroeg na het insult. De neuroregeneratieve benadering omvat A) aanmaak van nieuw weefsel m.b.v. stamceltherapie, B) stimuleren van celgroei m.b.v. behandeling met groeifactoren en [redacted] [redacted] zie ook **figuur 1**).

Deelproject	Onderwerp
1. Neuroprotectie	
A.	Remmen van celdood
B.	Remmen van inflammatie
2. Neuroregeneratie	
A.	Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie
B.	Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren
C.	[redacted]

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)

Deelproject 1A. Remmen van celdood

Na een insult in de hersenen kunnen de zenuwcellen op verschillende wijzen afsterven. Het is bekend dat celdood in de neonatale hersenen voornamelijk via apoptotische (geprogrammeerde) celdood-cascades verloopt. De laatste jaren is er door [redacted] en andere groepen veel onderzoek verricht om in kaart te brengen welke eiwitten cruciaal zijn bij het aanzetten van de apoptotische cascade in de neonatale hersenen. Zo heeft [redacted] [redacted] ontdekt dat het mitochondrium (de energiecentrale van de cel) een van de belangrijke intracellulaire locaties is waar de start van apoptose plaatsvindt [redacted]

Een zeer belangrijke ontdekking door onze groep is dat de eiwitten JNK en p53 vroeg na de start van HI (0-6 uur na HI) aan de mitochondriën binden en dat deze binding danwe [redacted] van de eiwitten terplekke met andere eiwitten het startsein geeft voor celdood [redacted]. Middels peptide remmers van [redacted] JNK (7,16) ofwel [redacted] p53 (PFT-mu; [redacted]) o.a. aangetoond dat het *kortdurend* remmen van [redacted] JNK of p53 zeer sterk de laesiegrootte in de hersenen verkleint en de motorisch en cognitieve functie van de dieren verbetert (o.a. [redacted] [redacted] tevens aangetoond dat het remmen van deze mitochondriale eiwitten in de hersenen de meeste

potentie heeft als dit binnen 6 uur na het insult gebeurt.

Belangrijk om te vermelden is dat JNK en p53 ook een belangrijke rol spelen als transcriptiefactoren bij de ontwikkeling van de hersenen (bv. p53 is een belangrijk tumor-suppressor gen). Bij onze experimenten is het daarom goed te benadrukken dat wij *kortdurend* alleen de *HI-geïnduceerde* activiteit van JNK of p53 remmen, en dus niet de *basale* activiteit die nodig is voor normale hersenontwikkeling. Bovendien worden bij de experimenten die wij uitvoeren alleen remmers gebruikt die specifiek de [REDACTED] JNK of p53 remmen. Bekend is dat voor tumorsuppressor gen werking van p53, het p53 eiwit in de celkern moet zitten en gedurende langere tijd gemuteerd of uitgeschakeld moet zijn (17). [REDACTED] echter aangetoond dat [REDACTED] remmers max 12 uur werken. Een tumorigene werking van deze remmers is dan ook niet te verwachten. [REDACTED] tevens geen negatieve lange-termijn effecten gevonden in de hersenen van behandelde dieren (15,16). Voor de remmers van JNK en p53 zijn [REDACTED] [REDACTED] reeds zowel dosis response- als therapeutische window-experimenten uitgevoerd waardoor de optimale doses en optimale behandelingsstrategie bekend zijn (t.w. 8 mg/kg PFT-mu en 10 mg/kg JNK-remmer, binnen 6 uur na HI).

De verschillende cascades die worden aangezet tijdens apoptose beïnvloeden elkaar als een soort sneeuwbal wat uiteindelijk leidt tot DNA schade en dood van de zenuwcel. [REDACTED] dat het van belang is om zoveel mogelijk bovenaan in deze cascade (t.w. op mitochondriaal niveau) in te grijpen, zodat zoveel mogelijk downstream effecten geremd worden (**figuur 1**, linksboven). Als voorbeeld, het remmen van [REDACTED] p53 of JNK is dus veel effectiever dan het remmen van één specifieke downstream caspase. Het is tot dusver niet bekend of er een [REDACTED] JNK en p53 aan het mitochondrium plaats vindt en of het remmen van [REDACTED] [REDACTED] nog effectiever kan zijn dan de p53- of JNK-remmers die [REDACTED] hebben gebruikt. Tevens is het van belang om [REDACTED] p53 en JNK met [REDACTED] [REDACTED] aan het mitochondriale membraan nader te bestuderen.

Preklinisch onderzoek heeft dus aangetoond dat het remmen van celdood een potentiële behandelingsstrategie is voor hersenschade in voldragen baby's, maar het is niet bekend of het remmen van celdood, bv specifiek van voorloper-OGD, ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen. Bestuderen wat behandeling met de [REDACTED] p53/JNK remmers zou kunnen doen op witte stof hersenschade is dan ook een zeer interessante onderzoeksvraag, te meer omdat het bekend is dat voorloper-OGD door *apoptotische* celdood sterven in het premature brein.

Deelproject 1B. Remmen van inflammatie

Neuroinflammatie is één van de belangrijke processen betrokken bij het ontstaan van neonatale hersenschade (**figuur 1**, linksonder). Geactiveerde microglia en astrocyten scheiden cytokines en chemokines uit, wat zorgt voor een inflammatoire respons op de plaats van het insult met het gevolg dat perifere immuuncellen worden aangetrokken. Inflammatie veroorzaakt meer demyelinisatie, meer celdood en dus meer weefselschade. [REDACTED] hebben in eerdere studies aangetoond dat het afremmen van neuroinflammatie door o.a. het remmen van TNF α of het remmen van microglia een positieve uitkomst geeft op HI hersenschade (7). Er is nog niet uitgezocht of het remmen van TNF α of de microglia ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen. Verder is er steeds meer bekend geworden dat de rol van TNF α afhankelijk is van het type TNF-receptor waaraan gebonden wordt. Het moduleren van de TNF α cascade o.a. door het toepassen van [REDACTED] [REDACTED] kan helpen om de rol van TNF α tijdens neonatale hersenschade verder op te helderen. Ook is er tot dusver weinig bekend wat het stimuleren van anti-inflammatie kan doen op hersenschade in het neonatale brein. Zo is er een [REDACTED] ontwikkeld van 2 belangrijke anti-inflammatoire cytokinen [REDACTED] wat in andere inflammatoire condities veelbelovend inflammatie kan afremmen. Bestuderen wat behandeling met anti-inflammatoire cytokinen zou kunnen doen op HI hersenschade dan wel witte stof hersenschade lijkt een zeer interessante strategie.

Voor de TNF-R [REDACTED] [REDACTED] experimenten zullen dose-response- en therapeutisch window experimenten worden uitgevoerd. Van de TNF-a remmer etanercept er [REDACTED] zullen we de dosis baseren op in de literatuur beschreven doses die effectief zijn bij neonatale hersenschade na acute asfyxie (18, 19).

2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neuraal weefsel)

Deelproject 2A. Aanmaak van nieuw neuraal weefsel (m.b.v. stamceltherapie)

Eerdere experimenten [REDACTED] hebben aangetoond dat stamceltherapie een van de meest belovende behandelstrategieën is voor het herstellen van reeds gevestigde neonatale hersenschade in voldragen baby's na acute asfyxie. Deze resultaten laten onder andere zien dat een eenmalige intranasale toediening van mesenchymale beenmerg-stamcellen zorgt voor neuroregeneratie in het schadegebied. Stamceltherapie stimuleert vorming van nieuwe neuronen en oligodendrocyten en verbetert zowel cognitie als motoriek. [REDACTED] de effectieve doses van de stamcellen bepaald tussen 0.5 tot 2.0 miljoen cellen per dier [REDACTED]. Het therapeutische venster voor behandeling is tot minstens 10 dagen na inductie van schade [REDACTED]. Op lange termijn (14 maanden) worden er geen macroscopische of microscopische afwijkingen en/of maligniteiten gevonden in de muizen die intranasaal behandeld zijn met stamcellen, wat de veiligheid van deze vorm van stamceltherapie onderschrijft [REDACTED]. Vastgesteld dat toegediende stamcellen niet zelf nieuwe cellen in het brein vormen (21). Hoewel de mechanismen grotendeels onbekend zijn, is de hypothese dat regeneratie het gevolg is van de secretie van neurotrofische stoffen door de getransplanteerde stamcellen, die vervolgens endogene stamcellen aanzetten tot proliferatie en differentiatie (**figuur 1**, rechtsboven).

Het is niet bekend of stamceltherapie ook effectief is wanneer de hersenen worden blootgesteld aan hypothermie. Dit is klinisch gezien een belangrijke vraag, aangezien hypothermie op dit moment standaard behandeling is voor pasgeboren baby's met ernstige acute asfyxie.

In ons voorgaande onderzoek hebben wij ons vnl gericht op het effect van stamceltherapie op het herstel van neuronale schade in voldragen baby's. Het is nog niet bekend of stamceltherapie effectief is bij herstel van witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's, bv doordat stamcellen groeifactoren kunnen uitscheiden die kunnen helpen bij overleving en uitrijping van oligodendrocyten (OGD).

Meest recente literatuur laat zien dat *optimalisatie* van stamceltherapie voor neuronaal herstel of myelinisatie-herstel mogelijk is, bv (a) door [REDACTED]-stamcellen of [REDACTED] stamcellen te gebruiken (deze zijn theoretisch mogelijk potenter dan bv mesenchymale stamcellen), of (b) door de stamcellen voorafgaand aan de transplantatie te conditioneren, bv door blootstelling aan [REDACTED] of door [REDACTED] van bepaalde belangrijke [REDACTED]. Dit is klinisch van groot belang om een zo groot mogelijke effectiviteit van de herstel-therapie te kunnen behalen.

Daarnaast is [REDACTED] een van de eersten geweest die stamceltherapie *intranasaal* heeft toegepast. Hoewel [REDACTED] de kinetiek, effectiviteit en veiligheid van deze toedieningsroute hebben aangetoond is het nog onbekend welke route de stamcellen vanuit de neusholte volgen naar het schadegebied en welke [REDACTED] hier een rol bij spelen. Voor toekomstige klinische toepassing is het erg belangrijk dit goed in beeld te brengen.

Deelproject 2B. Stimuleren van celgroei (m.b.v. groeifactoren)

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat behandeling met groeifactoren zorgt voor herstel van hersenschade na acute asfyxie in neonatale knaagdieren. Het is niet bekend of groeifactoren ook bij kunnen dragen aan herstel van witte stof hersenschade. Wel laten onze *in vitro* experimenten zien dat bijvoorbeeld de groeifactor [REDACTED] belangrijk is bij het uitrijpen van voorloper-OGDs naar volwassen OGDs die myeline kunnen maken (**figuur 1**, rechts-midden). Of (combinaties van) groeifactoren ook *in vivo* OGDs kunnen aanzetten tot myelineproductie en zo witte stof schade kunnen herstellen is nog onbekend. We zullen onze dose-response/window experimenten met groeifactoren baseren op in de literatuur beschreven doses/windows die effectief zijn bij neonatale hersenschade na acute asfyxie (o.a. 22, 23).

Deelproject 2C. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

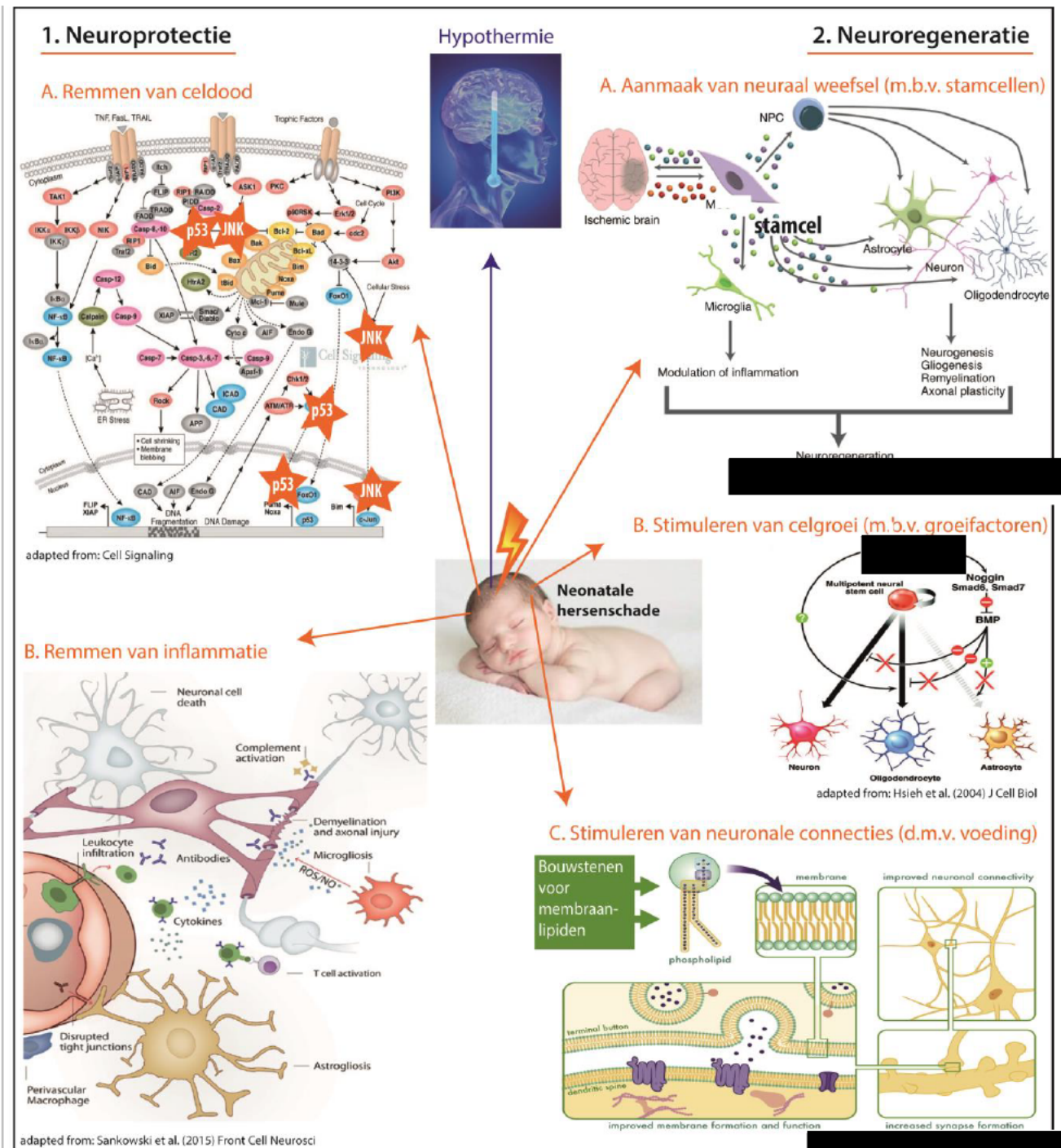
Referenties

[REDACTED]

Lee et al. 2013 *Pediatr Res*
Wang et al. 2009 *J Immunol*
Nelson et al. 2000 *Curr Opin Neurol*
Salmaso et al. 2014 *Nat Neurosci*
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Shen et al. 2010 *J Vis Exp*
Shen et al. 2012 *J Neurosci Res*
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
vd Kooij et al. 2010 *Brain Behav Immunol*
Van der Kooij et al. 2010 *Neurobiol Dis*
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
Vaseva & Moll. 2009 *Biochim Biophys Acta*
[REDACTED]
Mesples et al. 2003 *Brain Res Dev*
[REDACTED]
[REDACTED]
Lin et al. 2009 *Exp neurol*
Cai et al. 2011 *Neurosci*
[REDACTED]
Pallier et al. 2015 *Neurobiol Dis*
Enry et al. 2015 *Nat Neurosci*
Berer et al. 2011 *Nature*
Mayer et al. 2015 *J Clin Invest*
D’Mello et al. 2015 *J Neurosci*
Smith et al. 2014 *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*



Figuur 1. De deelprojecten van de projectaanvraag richten zich op: 1A) remmen van inflammatie, 2A) aanmaak van nieuw neurale weefsel, 2B) stimuleren van celgroei, en 2C) stimuleren van neuronale connecties.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- iv. In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- v. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Algemene doelstelling

Het algemene doel van deze gehele projectaanvraag is het identificeren en testen van mogelijke neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies voor neonatale hersenschade in klinisch relevante diermodellen voor de drie patiënten-doelgroepen die we hierboven hebben gedefinieerd, t.w. 1) voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie, 2) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies, en 3) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies.

Voor het **identificeren** van therapeutische interventies onderzoeken we de mechanismen die betrokken zijn bij neonatale hersenschade. Het is bekend dat neonatale hersenschade ontstaat uit een gecompliceerde interactie tussen verschillende pathofysiologische mechanismen. Deze interactie vindt niet alleen plaats tussen de verschillende cellen in de hersenen (zenuwcellen, oligodendrocyten, microglia en astrocyten), maar betreft daarbuiten bijvoorbeeld ook de endotheelcellen die de bloed-hersen barrière vormen en verscheidene typen perifere immuun cellen die de plaats van de laesie kunnen infiltreren. Meer kennis over deze mechanismen kan zorgen voor effectievere combinaties van neuroprotectieve en neuroregeneratieve strategieën ter behandeling van neonatale hersenschade.

Voor het **testen** van therapeutische interventies, richten we ons op zowel bescherming (neuroprotectie) als op herstel (neuroregeneratie) van het pasgeboren brein. In ongeveer de helft van de pasgeboren baby's met hersenschade is het startmoment van het insult exact definieerbaar, waardoor in de vroege periode na HI (meestal binnen 6 uur na HI) de hersenen **beschermd** kunnen worden tegen vroege schade. Bij de andere helft van de pasgeborenen met hersenschade is het insult chronischer van aard of pas later waargenomen, waardoor het startmoment minder goed definieerbaar is. Voor deze groep patiënten zijn therapieën nodig die zich niet richten op remmen van vroege schade (omdat men daarvoor te laat is), maar zich richten op **inductie van herstel**.

Doelstellingen en onderzoeksvragen per deelproject

Hieronder hebben we per deelproject de bijbehorende doelstelling en onderzoeksvragen geformuleerd. Allereerst is een beknopte samenvatting gegeven van de doelstellingen per deelproject, die uitgebreider worden geformuleerd met bijbehorende onderzoeksvragen in de onderstaande tekst.

Samenvatting van de doelstellingen per deelproject:

1. **Neuroprotectie**
 - A.** Remmen van celdood cascades
 - i. Bestuderen of het remmen van de ██████████ JNK en P53 aan het ██████████ membraan een effectievere therapie is dat het alleen remmen van JNK ofwel p53 ter bescherming van neuronale celdood als gevolg van acute asfyxie.
 - ii. Testen of P53 en JNK remmers bijdragen aan het voorkomen van diffuse witte stof hersenschade
 - B.** Remmen van inflammatie
 - i. Testen of ingrijpen in de TNF α cascade beschermt tegen neuroinflammatie en daaruit voortkomende hersenschade
 - ii. Testen of anti-inflammatoire cytokines neuroinflammatie remmen en op die wijze hersenschade kunnen verminderen
2. **Neuroregeneratie**
 - A.** Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie
 - i. Onderzoeken of hypothermie de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie beïnvloedt
 - ii. Onderzoeken of stamceltherapie witte stof hersenschade kan herstellen
 - iii. Optimaliseren van de neuroregeneratieve capaciteit van stamcellen ██████████ ██████████
 - iv. Ophelderen van de intranasale route die stamcellen volgen naar het schadegebied en de daarbij betrokken ██████████ ██████████
 - B.** Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren

- i. Onderzoeken welke (combinatie van) groeifactoren zorgen voor functioneel herstel na witte stof hersenschade

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)

Deelproject 1A. Remmen van neuronale en OGD celdood

- Doelstellingen:
 - i. Omdat het dusver niet bekend is welk eiwit in de celdood cascades het beste doelwit is om hersenschadeschade te remmen, is het doel van dit deelproject de effectiviteit van eiwitremmers van () de P53 en JNK cascades te testen ter bescherming van neuronale celdood als gevolg van acute asfyxie (doelgroep 1).
 - ii. Daarnaast is het is niet bekend of het remmen van OGD celdood witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen (doelgroep 3). Het tweede doel is daarom het testen van effectiviteit van P53 en JNK remmers ter voorkoming van diffuse witte stof hersenschade.
- Onderzoeksvragen:
 - i. Helpt aangrijpen in de p53 en JNK cascades bij het voorkomen van mitochondriële schade na acute asfyxie (doelgroep 1)?
 - ii. Helpt remming van de P53 of JNK cascade ter voorkoming van diffuse witte stof hersenschade (doelgroep 3)?

Deelproject 1B. Remmen van inflammatie

- Doelstellingen:

Neuroinflammatie kan geremd worden middels i.) het *remmen* van pro-inflammatoire cytokines of ii.) het *stimuleren* van een anti-inflammatoire respons.

 - i. TNFa is een van de belangrijkste pro-inflammatoire cytokines geproduceerd in de hersenen. Het moduleren van de pro-inflammatoire TNFa cascade zal worden bewerkstelligd door het toedienen van specifieke
 - ii. Anti-inflammatoire cytokines zoals en remmen inflammatie. werken aan de anti-inflammatoire effecten van een van . Het doel van dit deelproject is onderzoeken of bijdragen aan bescherming van de hersenen door remming van neuroinflammatie.

Omdat neuroinflammatie een belangrijke rol speelt bij zowel hersenschade als gevolg van acute asfyxie en diffuse witte stof schade willen we bovengenoemde strategieën onderzoeken in modellen voor doelgroep 1 en 3.
- Onderzoeksvragen:
 - i. Kan neuroinflammatie geremd worden door het moduleren van de TNFa cascade en vervolgens het brein beschermen tegen hersenschade als gevolg van acute asfyxie of diffuse witte stof schade (doelgroep 1, resp 3)?
 - ii. Kunnen anti-inflammatoire cytokines of het neuroinflammatie remmen als gevolg van acute asfyxie of diffuse witte stof schade (doelgroep 1, resp 3)?

2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neuraal weefsel)

Deelproject 2A. Aanmaak van nieuw neuraal weefsel (m.b.v. stamceltherapie)

- Doelstellingen:

Ons voorgaand onderzoek heeft laten zien dat stamceltherapie een veelbelovende toepassing is voor herstel van neonatale hersenschade.

 - i. Omdat hypothermie (koelen) op dit moment standaard klinische zorg is na acute asfyxie (doelgroep 1), is het van belang te onderzoeken of hypothermie de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie beïnvloedt.
 - ii. heeft laten zien dat stamceltherapie neuronale schade na acute asfyxie kan herstellen en het gedrag van de muizen kan verbeteren. In dit

zullen wij bestuderen of stamceltherapie ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's (doelgroep 2) kan herstellen.

- iii. [redacted] onderzoek heeft laten zien dat stamceltherapie zorgt voor substantieel maar niet volledig herstel van hersenschade. Modificaties van stamcellen, o.a. door een andere [redacted] te gebruiken (bv [redacted]-stamcellen of [redacted] stamcellen) of dmv optimale kweekcondities of [redacted] van [redacted], kunnen daarom de potentie van stamceltherapie vergroten voor hersenschade als gevolg van acute asfyxie en witte stof hersenschade (doelgroep 1, resp 2).
- iv. Om intranasale toepassing van stamcellen zo effectief en veilig mogelijk te maken, wordt onderzocht welke route de stamcellen vanuit de neusholte volgen naar het schadegebied en welke [redacted] hierbij een rol spelen (doelgroep 1).
- Onderzoeksvragen:
 - i. Beïnvloedt hypothermie (koeling) de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie? (doelgroep 1)
 - ii. Is het mogelijk schade in de witte stof te herstellen en verbetering van functie te bewerkstelligen middels stamceltherapie? (doelgroep 2)
 - iii. Kunnen modificaties van de stamcellen, d.m.v. andere bron, optimale kweekcondities of [redacted] van [redacted] [redacted], de potentie van stamceltherapie vergroten? (doelgroep 1 en 2)
 - iv. Welke migratieroute wordt gebruikt en welke [redacted] zijn betrokken bij migratie van stamcellen vanuit de neusholte naar de laesie? (doelgroep 1)

Deelproject 2B. Stimuleren van celgroei (m.b.v. groeifactoren)

- Doelstellingen:
 - i. Omdat *in vitro* experimenten laten zien dat bijvoorbeeld de groeifactor [redacted] belangrijk is bij het uitrijpen van oligodendrocyte voorlopercellen naar volwassen oligodendrocyten die myeline kunnen maken, willen we onderzoeken of [redacted] ook *in vivo* zorgen voor OGD maturatie en kunnen leiden tot herstel van witte stof hersenschade (doelgroep 2).
- Onderzoeksvragen:
 - i. Welke groeifactoren kunnen uitrijping van OGDs stimuleren en witte stof schade herstellen? Welke combinaties van groeifactoren zorgen voor het grootste functioneel herstel na witte stof hersenschade? (doelgroep 2)

[redacted]

- [redacted]
 - [redacted]
 - [redacted]
 - [redacted]
- [redacted]
 - [redacted]
 - [redacted]

Haalbaarheid van het project

De deelprojecten worden uitgevoerd door verschillende AIO's, biotechnici en post-doctoraal onderzoekers binnen de onderzoeksgroep. Dit geeft de gelegenheid om de deelprojecten in parallel uit te voeren. Hierdoor zullen deelprojecten in tijd overlappen en is er veel samenwerking tussen de betrokken onderzoekers.

[redacted] en de [redacted] onderzoekers hebben [redacted] ervaring met translationeel onderzoek naar neuroprotectieve en neuroregeneratieve behandelingenstrategieën voor neonatale hersenschade. Alle modellen en technieken die beschreven zijn in dit project worden [redacted] en [redacted] succesvol uitgevoerd. Omdat de beschreven modellen lopend zijn, kunnen de behandelingstrategieën direct getest worden. Daarbij vindt dit onderzoek plaats

in nauwe samenwerking met klinici van de afdeling ██████████ in het ██████████, waardoor de klinische toepasbaarheid van mogelijke therapieën een cruciaal vereiste is voor het testen in de diermodellen.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Wereldwijd ondervinden 1,15 miljoen pasgeboren baby's (8,5 per 1000 levend geboren) een HI insult, wat in 25% leidt tot peri- of postnatale sterfte (jaarlijks 287.000 levend geboren). Van de pasgeboren baby's die het HI insult overleven ontwikkelt 35% permanente neurologische afwijkingen. Jaarlijks betreft dit naar schatting 414.000 pasgeboren baby's. Daarnaast is vroeggeboorte een steeds meer voorkomend probleem in de kliniek; inmiddels wijzen de cijfers uit dat ~10% van alle baby's te vroeg wordt geboren (onder 37 weken gestatie-leeftijd). De verhoogde prevalentie wordt toegeschreven aan drie belangrijke oorzaken; 1) stijging van de gemiddelde leeftijd van de moeder, 2) verhoogde prevalentie van meerlingzwangerschappen door kunstmatige bevruchting, en 3) verhoogde prevalentie van medisch opgewekte vroeggeboorte ter bescherming van de baby (1). Door vooruitgang in de zorg blijven steeds meer (extreem) vroeggeboren kinderen in leven maar de morbiditeit bij deze kinderen blijft onveranderd hoog en 30-50% ontwikkelt milde tot ernstige neurologische problemen.

De hersenschade in zowel voldragen als te vroeg geboren baby's kan zorgen voor levenslange handicaps, cognitieve achterstand, ontwikkeling van epilepsie, gedragsproblematiek (o.a. ADHD), en psychologische en psychiatrische ziektebeelden (autisme en schizofrenie zijn gelinkt met o.a. vroeggeboorte) (2). Daarom heeft neonatale hersenschade aanzienlijke psychosociale en economische consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. Bescherming van het kwetsbare pasgeboren brein en behandeling van neonatale hersenschade is wereldwijd van groot belang, zodat de kwaliteit van leven van de patiëntjes verbeterd wordt. Om bescherming te bewerkstelligen, is het essentieel om de complexe interacties tussen de verschillende pathofysiologische mechanismen in kaart te brengen die betrokken zijn bij het ontstaan van neonatale hersenschade en de daaruit voortkomende afwijkingen in functioneren. Nieuwe inzichten kunnen leiden tot ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën. Het ontwikkelen van nieuwe en effectieve behandelingen zal leiden tot permanente verbetering van de kwaliteit van leven voor de patiënt, diens omgeving, gezin en de maatschappij.

1. Denney et al. 2008 Womens Health
2. Mwaniki et al. 2012 Lancet

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Algemene projectstrategie

De hoofddoelstelling van deze gehele projectaanvraag is het identificeren en testen van mogelijke neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies voor neonatale hersenschade in klinisch relevante diermodellen voor de drie patiënten-doelgroepen die we hierboven hebben gedefinieerd, t.w. 1) voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie, 2) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies, en 3) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies.

De algemene projectstrategie van dit projectvoorstel is dan ook het testen van verschillende neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies in de relevante diermodellen voor de bovengenoemde drie vormen van neonatale hersenschade. Bij elk dierexperiment dat uitgevoerd wordt zullen de volgende stappen gevolgd worden.

STAP 1: In vitro experimenten

Waar mogelijk zullen voorafgaand aan de dierproeven zoveel mogelijk vragen beantwoord worden met

behulp van *in vitro* experimenten met neuronale of gliale cellen. De neuronale cellen kunnen cellijnen zijn, of deze kunnen tezamen met gliale cellen (oligodendrocyten, astrocyten en microglia) in grote aantallen geïsoleerd worden uit de hersenen van dieren uit bijlage III en opgekweekt per celtype. Deze celculturen kunnen blootgesteld worden aan potentiële therapeutische stoffen waarna onderzocht kan worden wat het effect is op bijvoorbeeld celdood, celdifferentiatie of inflammatie.

STAP 2: Keuze van het meest relevante diermodel

Wanneer *in vitro* experimenten hebben uitgewezen dat een bepaalde stof mogelijk als therapie zou kunnen dienen ter behandeling van neonatale hersenschade, is het van belang dit te testen in een van de drie relevante diermodellen. Een diermodel wordt alleen relevant geacht wanneer de beoogde patiëntenpopulatie (doelgroep) in theorie baat zou hebben bij de betreffende behandeling.

In **diermodel 1**, een model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1), zijn zowel neuroprotectieve als neuroregeneratieve behandelstrategieën relevant: de hersenen kunnen direct na het insult beschermd worden tegen celdood en inflammatie, en de chronische laesie die ontstaat kan vervolgens mogelijk verkleind worden door therapieën die zich richten op inductie van herstel, zoals stamceltherapie.

Diermodel 2 is een model voor te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies (doelgroep 2). Omdat deze pathologie gekarakteriseerd wordt door focale laesies die zich in verloop van dagen/weken in de witte stof ontwikkelen, is het met name relevant om in dit model behandelstrategieën gericht op celtherapie te onderzoeken. De focus binnen dit model ligt dan ook op het geven van stamcellen en groeifactoren die endogene cellen aanzetten tot herstel van de focale laesies.

Diermodel 3 is een model voor te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en maternale infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies (doelgroep 3). Omdat de witte stof schade diffuus is en er geen focale laesies te herstellen zijn, zullen behandelstrategieën niet gericht worden op celtherapie, maar op het remmen van OGD celdood en neuroinflammatie.

De keuze voor de juiste patiëntenpopulatie en bijbehorende relevante diermodellen is reeds in overleg met neonatologen vastgesteld en weergegeven in de tabel van 3.4.2. De experimentele opzet van elk diermodel wordt tevens verder uitgelegd in 3.4.2.

STAP 3: Keuze van toedieningsvormen van therapeutische interventies

De toedieningsvorm is afhankelijk van de therapeutische interventie en aard van de onderzoeksvraag.

Deelproject	Therapie	Mogelijke toedieningsvormen
1A 1B	P53/JNK remmers TNFα [redacted] [redacted]	Een van de volgende: - intra-peritoneaal - intra-craniaal - subcutaan
2A 2B	Stamcellen Groeifactoren	Een van de volgende: - intra-nasaal - intra-craniaal
2A i	Hypothermie	- lichaamstemp verlagen tot 32°C
2C	[redacted]	[redacted] [redacted] [redacted]

Deelprojecten 1A en 1B:

Eiwitten die betrokken zijn bij de P53/JNK cascade of bij inflammatie (TNFα, [redacted]) kunnen gemoduleerd worden d.m.v injectie van molecuul/peptideremmers die ingrijpen op deze

cascades.

In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten intra-peritoneaal of subcutaan, tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barrière te passeren. In dat geval wordt gekozen voor intra-craniale injectie.

Deelprojecten 2A en 2B:

Stamcellen kunnen intra-nasaal of intra-craniaal worden toegediend, afhankelijk van de onderzoeksvraag en de soort stamcellen. Intra-craniale toediening zal worden gebruikt wanneer we een fundamentele vraag willen beantwoorden. Een voorbeeld uit deelproject is 2A.iv is: Wordt migratie van stamcellen beïnvloed als we [REDACTED] factor x verhoogd tot expressie brengen? In dit voorbeeld zal dus worden gekozen voor lokale intra-craniale toediening van factor x.

Intra-nasale toediening zal worden gebruikt wanneer we de therapeutische eigenschappen van een groeifactor of stamcel willen onderzoeken of de nasale route willen ontrafelen van stamcellen naar plaats van schade.

In de experimenten onder 2A waarin stamceltherapie toegepast wordt, zullen uit beenmerg-afkomstige muizen mesenchymale stamcellen gebruikt worden tenzij anders aangegeven. Deze beenmerg-stamcellen worden aangeschaft via Invitrogen, zijn volledig gekarakteriseerd, zullen onder strikte protocollen steriel gekweekt en gepasseerd worden (maximaal passage 6) tot aan de behandeling in de dieren.

Een uitzondering is bv deelproject 2A iii, waarin we naar de potentie van stamcellen uit verschillende [REDACTED] willen kijken, o.a. [REDACTED]-stamcellen (afkomstig van farmaceut) en [REDACTED] stamcellen (R&D). Ook deze cellen zijn volledig gekarakteriseerd en zullen onder vergelijkbare strikte protocollen steriel gekweekt en gepasseerd worden.

In deelproject 2A iii, zal ook getracht worden de potentie van stamceltherapie te vergroten door de stamcellen voorafgaand aan de toediening te preconditioneren, bv door blootstelling aan een [REDACTED] kweekomgeving of door middel van [REDACTED] [REDACTED]. Voor deze laatstgenoemde experimenten zullen muizen beenmerg-stamcellen gebruikt worden.

Indien we geïnteresseerd zijn in het effect van stamceltherapie of groeifactoren op de proliferatie van endogene stamcellen in de hersenen, zal d.m.v. intra-peritoneale BrdU injecties (max 10) gekeken worden naar celdeling in het brein.

Hypothermie zal worden toegepast in experimenten die worden uitgevoerd onder doelstelling 2A.i. Hierbij worden pups blootgesteld aan een omgevingstemperatuur die zorgt voor een constante lichaamstemperatuur van 32-35°C gedurende max. 4 uur.

Deelproject 2C

[REDACTED]

STAP 4: Keuze van uitleesparameters

Primaire uitkomstparameters en einde van het experiment

De primaire uitkomstparameters volgen uit 1) gedragsexperimenten zonder bijkomend ongerief (o.a. voor cognitie en motoriek), en 2) anatomische/histologische en 3) biochemische analyses van de hersenen voor het bepalen van de mate van hersenschade. Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden dieren op een tijdstip tussen de 0 dagen en 4 maanden opgeofferd middels een overdosis pentobarbital voor verdere analyse van weefsels.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Toepassing van de verschillende diermodellen

In de onderstaande tabel is kort per doelstelling weergegeven welk diermodel wordt gebruikt. In de tekst

daaronder en in **figuur 2** wordt per diersmodel de experimentele opzet uitgelegd.

Deelproject	Doelstelling	Doelgroep	Diersmodel
1A	i. meest effectieve eiwitremmer ██████████	1	1
	ii. remming ██████████ bij witte stof schade	3	3
1B	i. aangrijpen op ██████████	1 en 3	1 en 3
	ii. remmen van inflammatie met ██████████	1 en 3	1 en 3
2A	i. stamceltherapie na koelen	1	1
	ii. stamceltherapie bij witte stof hersenschade	2	2
	iii. optimalisatie van stamcellen	1 en 2	1 en 2
	iv. nasale route ontrafelen	1	1
2B	i. groeifactoren voor herstel van witte stof schade	2	2
2C	i. ██████████	1	1
	ii. ██████████	1	1

Diersmodel 1. Model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1)

Wanneer dieren op P7-9 worden blootgesteld aan HI (**Bijlage I**), is de hersenschade vergelijkbaar met hersenschade geïnduceerd door acute asfyxie in voldragen baby's (doelgroep 1). Deze is gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuzie laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Dit model wordt zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Het model van HI hersenschade in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies, terwijl de hersenschade in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt. Afhankelijk van de vraagstelling, de patiëntgroep en de beoogde mate van effect van de therapie of de verkrijgbaarheid van allogene cellen (bv muizen stamcellen) zal voor ofwel het muis- ofwel het rat-model gekozen worden om resp. milde ofwel ernstige hersenschade als gevolg van acute asfyxie na te bootsen.

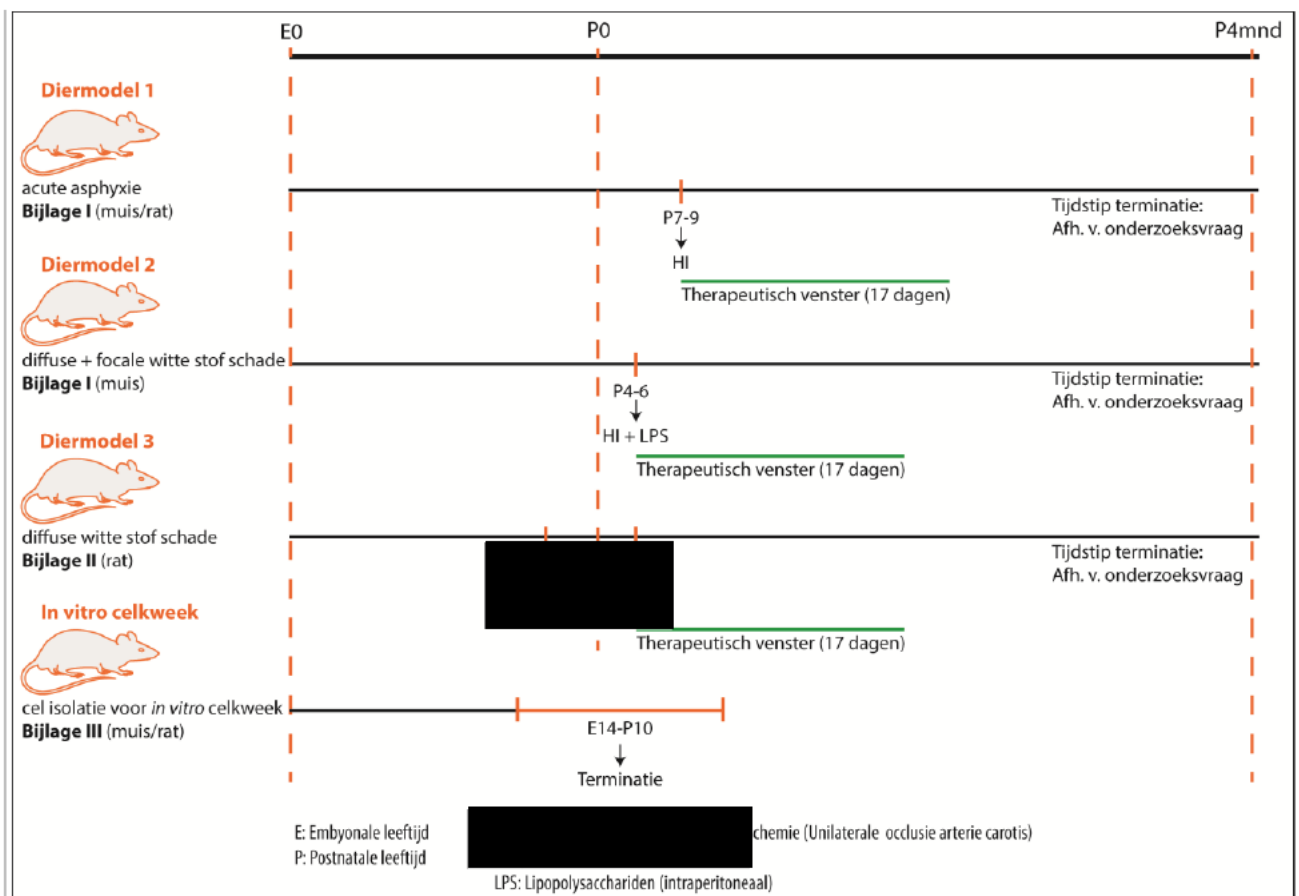
Diersmodel 2. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade met focale laesies (doelgroep 2)

Omdat zowel inflammatie als hypoxie belangrijke componenten zijn bij het ontstaan van witte stof hersenschade, hebben we een diersmodel ontwikkeld waarin de muizen worden blootgesteld aan HI+LPS op P4-6 (**Bijlage I**). Dit induceert niet-cysteuzie diffuse witte stof schade met focale laesies, zoals wordt waargenomen in 35% van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade (doelgroep 2).

Diersmodel 3. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade zonder focale laesies (doelgroep 3)

Wanneer dieren ██████████ worden blootgesteld en op ██████████ ondergaan, ontstaat een diffuse vorm van witte stof schade zonder focale laesies, zoals wordt waargenomen in 57 % van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade (**Bijlage II**).

Met behulp van primaire celwee kunnen we mechanistische vragen beantwoorden over de complexe interactie tussen verschillende cellen die betrokken zijn bij het ontstaan van hersenschade en kunnen we de effecten van verschillende componenten testen op inflammatoire en apoptotische cascades. Voor deze *in vitro* testen worden neuronen, microglia, oligodendrocyten en astrocyten geïsoleerd uit weefsel van embryonale of neonatale ratten of muizen (**Bijlage III**). Na isolatie van de neurale cellen onderzoeken we in het lab hoe deze cellen reageren op verschillende stimuli (inflammatie-factoren, excitotoxiciteit, oxidatieve stress) en of we processen zoals apoptose, proliferatie, differentiatie, en inflammatie kunnen beïnvloeden door blootstelling aan potentiële therapeutische componenten. Dit wordt gedaan aan de hand van morfologische inspectie, immunofluorescente kleuringen, en bepaling van eiwitconcentraties. Dit *ex vivo* en *in vitro* onderzoek is belangrijk aangezien het nieuwe kennis oplevert over de moleculaire mechanismen die een rol spelen bij het ontstaan van neonatale hersenschade. Deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's, en hersenschade na acute asfyxie in voldragen baby's.



Figuur 2. Verschillende type diermodellen zoals beschreven in de verschillende bijlagen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

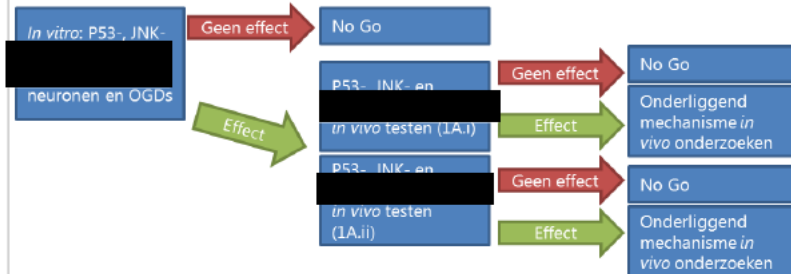
Strategie per deelproject

In de onderstaande tekst en figuren is de strategie per deelproject uitgewerkt. Om te bepalen of een behandeling *in vivo* een effect heeft, wordt als primaire uitkomstparameter bv een motorische gedragstest, een anatomische analyse of biochemische analyse op de hersenen uitgevoerd. Wanneer op deze uitkomstparameter(s) geen significant verschil wordt gevonden ten opzichte van de vehicle behandelde groep, definiëren we dat als "geen effect".

Deelproject 1A. Remmen van neuronale en OGD celdood

In dit deelproject zullen er allereerst *in vitro* experimenten uitgevoerd worden op zoek naar effectieve molecuul-/peptideremmers [redacted] de P53 en JNK cascades in neuronen en OGDs. De remmers zullen *in vivo* worden getest op het beschermen tegen neuronale schade na HI (diermodel 1). Wanneer er geen effect wordt gevonden zal er gestopt worden met het testen van deze remmer. Wanneer er *in vitro* een effect wordt gevonden, worden er meerdere outcome experimenten uitgevoerd (zie figuur 3) om de effecten van de remmers in kaart te brengen op meerdere parameters (bv vrije radicaal vorming (vroeg biochemie), gedrag (lange termijn) en celdood (histologie)). Met de informatie uit de *in vitro* experimenten met OGDs zal tevens onderzocht worden of remmers van [redacted] P53 en JNK ook bijdragen aan het voorkomen van witte stof hersenschade (diermodel 3).

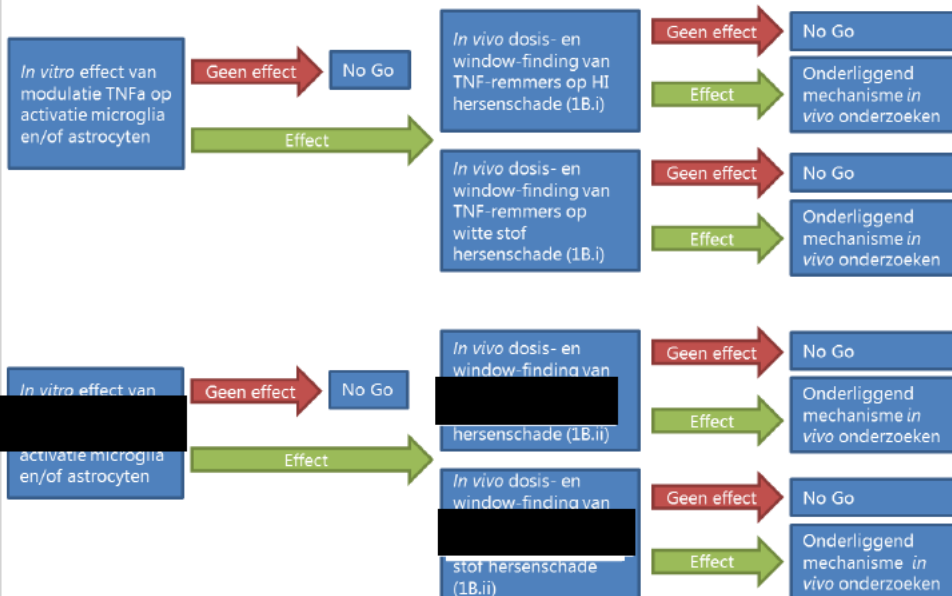
Hypothese: Het remmen van de JNK en p53 cascades remt apoptotische celdood in neuronen en OGD en draagt zo bij aan het verminderen van hersenschade na acute asfyxie, dan wel witte stof schade



Deelproject 1B. Remmen van inflammatie

In dit deelproject zullen er allereerst *in vitro* experimenten uitgevoerd worden om het effect van modulatie van TNFa (deelproject 1B.i) dan wel [redacted] receptoren (deelproject 1B.ii) te bepalen. Indien er geen effect wordt gevonden, zullen de *in vivo* experimenten niet worden uitgevoerd. Indien er wel een effect wordt gevonden, worden *in vivo* dose/window experimenten uitgevoerd en wordt er met de optimale dosis/window het effect op HI hersenschade (diermodel 1) en witte stof hersenschade (diermodel 3) bepaald. Mocht de behandeling bijdragen aan herstel van hersenschade, dan wordt verder onderzoek verricht naar het onderliggende mechanisme op verschillende outcome parameters.

Hypothese: Het remmen van neuroinflammatie ofwel door het afremmen van pro-inflammatie (TNFa) ofwel door het stimuleren van anti-inflammatie [redacted] vermindert hersenschade na acute asfyxie, dan wel witte stof hersenschade



Deelproject 2A. Aanmaak van nieuw neuraal weefsel (m.b.v. stamceltherapie)

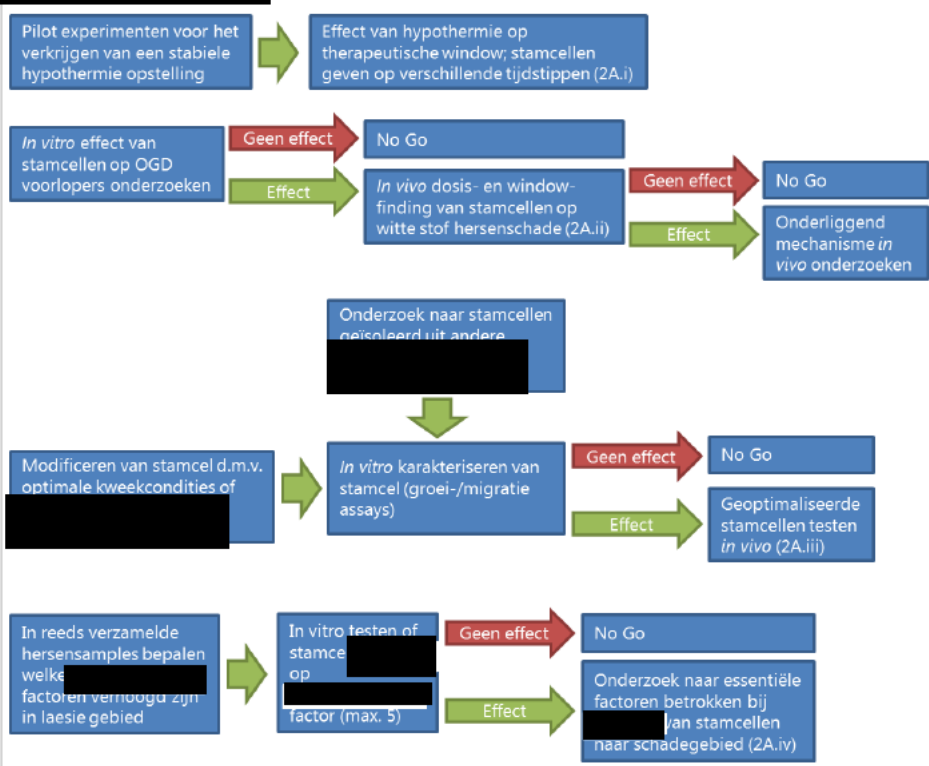
In deelproject 2A.i. worden eerst pilot experimenten uitgevoerd voor het opzetten van een stabiele hypothermie opstelling. Daarna wordt onderzocht wat het effect is van hypothermie op het therapeutische window van stamceltherapie in hersenschade na HI (diermodel 1).

In deel project 2A.ii. wordt eerst *in vitro* getest of de stamcel effect heeft op oligodendrocyte uitrijping. Indien er een effect wordt gevonden, wordt *in vivo* onderzoek gedaan naar de dosis en window van stamceltherapie bij witte stof hersenschade (diermodel 2).

In deelproject 2A.iii. wordt eerst *in vitro* de stamcel gemodificeerd en het effect op groei of migratie gekarakteriseerd. Indien er een effect wordt gevonden, wordt vervolgens *in vivo* onderzoek gedaan naar de potentie van de stamcel bij het herstel van HI (diermodel 1) dan wel witte stof hersenschade (diermodel 2).

In deelproject 2A.iv. wordt eerst in eerder verzameld hersenweefsel bepaald welke factoren verhoogd aanwezig zijn in het laesiegebied. Vervolgens wordt *in vitro* getest of stamcellen migreren op deze (max 5). In dit het geval is, zal *in vivo* onderzoek worden gedaan naar de die betrokken zijn bij van stamcellen naar het schadegebied (diermodel 1).

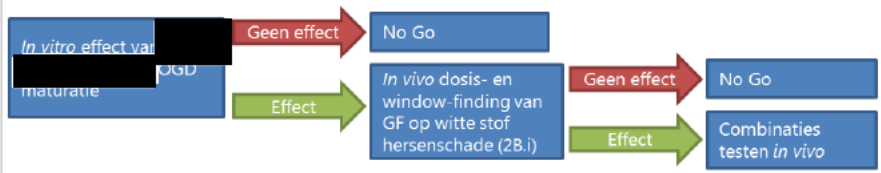
Hypothese:



Deelproject 2B. Stimuleren van celgroei (m.b.v. groeifactoren)

Allereerst zal *in vitro* het effect van groeifactoren (GF) worden bepaald op OGD maturatie. Indien een effect wordt gevonden, worden *in vivo* dose/window experimenten uitgevoerd en wordt er met de optimale dosis/window onderzocht of deze GF bij kan dragen aan het herstellen van witte stof hersenschade (diermodel 2). Indien er een effect wordt gevonden, worden vervolgens combinaties van de meest potente groeifactoren *in vivo* getest.

Hypothese:



Deelproject 2C:

Hypothese:

De bovenstaande deelprojecten worden uitgevoerd door verschillende AIO's, biotechnici en post-doctoraal onderzoekers binnen de onderzoeksgroep. Dit geeft de gelegenheid om de deelprojecten in parallel uit te voeren. De verworven resultaten per deelproject zullen het startmoment van de andere deelprojecten niet beïnvloeden, waardoor deze in tijd zullen overlappen.

Dierproefoverzicht

In figuur 3 staat een volledig overzicht van alle uit te voeren dierproeven per deelproject en bijbehorend diermodel. Hierin staat tevens of dosis en/of therapeutisch window bekend is van de betreffende teststof, of dat dosis- en/of therapeutisch window-experimenten nog worden uitgevoerd.

Deelproject	Omschrijving	Dosis bekend?	model 1	model 2	model 3	Window bekend?	model 1	model 2	model 3	Outcome experiment (met optimale dosis en window)	model 1	model 2	model 3	
			muus	rat	muus		muus	rat	muus	opofferingsmomenten	muus	rat	muus	rat
1A	JNK remmend peptide	ja (10 mg/kg)				JA; direct na HI schade								
	p53 remmend peptide	ja (8 mg/kg)				JA; direct na HI schade								
	interactie JNK-p53 remmer	ja (10 mg/kg)				JA; direct na HI schade								
1B		dosis respons uitvoeren	1x	1x	1x	theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x	1x	1x					
		dosis respons uitvoeren	1x	1x	1x	theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x	1x	1x	2				
	TNF-remmer (etanercept)	ja (5 mg/kg)				theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x	1x	1x					
		dosis respons uitvoeren	1x		1x	theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x		1x					
		ja (50 ng)				theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x		1x	3				
		ja (50 ng)				theapeutisch window uitvoeren (0-72u)	1x		1x					
2A														
I.	stamcellen+hypothemie	ja (0.5-2.0 x10E6 c)				theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)	1x			2				
II.	stamcellen-witte stofschade	dosis respons uitvoeren		1x		theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)		1x		2				
III.	stamcel source	dosis respons uitvoeren	2x	1x		theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)	1x		1x	1				
III.	stamcellen	ja				JA; tot 10 dagen				2				
III.	stamcellen	ja				JA; tot 10 dagen				2				
IV.	stamcellen route	ja (0.5-2.0x10E6 c)				JA; tot 10 dagen				3				
2B		dosis respons uitvoeren		3x		theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)		1x		3				
		(literatuur: 10-200 ng)												
2C		dosis respons uitvoeren	1x			theapeutisch window uitvoeren	1x			2				
		dosis respons uitvoeren	1x			theapeutisch window uitvoeren	1x			2				

Figuur 3: Overzicht van alle uit te voeren dierproeven

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2)
2	Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3)
3	Neuronale en gliale cellen voor primaire celkweek
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2) |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Experimentele aanpak

In deze experimenten onderzoeken we mogelijke behandelingen voor het voorkomen of herstellen van hypoxische-ischemische (HI) hersenschade. HI hersenschade wordt geïnduceerd in pasgeboren muizen of ratten middels permanente unilaterale afsluiting van de halsslagader (a. carotis), gevolgd door blootstelling aan systemische hypoxie. [redacted] heeft [redacted] met dit model, dat wereldwijd gebruikt wordt als model voor neonatale hersenschade als gevolg van hypoxische ischemie; het zogenaamde Vannucci-Rice model [redacted]

Diermodel 1. Model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1)

Wanneer dieren op P7-9 worden blootgesteld aan HI, is de hersenschade vergelijkbaar met hersenschade geïnduceerd door acute asfyxie in voldragen baby's (doelgroep 1). Deze is gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuze laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Dit model wordt zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Het model van HI hersenschade in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies, terwijl de hersenschade in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt. Afhankelijk van de vraagstelling, de patiëntgroep en de beoogde mate van effect van de therapie of de verkrijgbaarheid van allogene cellen (bv muizen stamcellen) zal voor ofwel het muis- ofwel het rat-model gekozen worden om resp. milde ofwel ernstige hersenschade als gevolg van acute asfyxie na te bootsen.

Diermodel 2. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade met focale laesies (doelgroep 2)

Blootstelling aan HI+LPS op P4-6 in muizen induceert niet-cysteuze diffuse witte stof schade met focale laesies zoals wordt waargenomen in 35% van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade

(doelgroep 2).

Omdat bij te vroeg geboren baby's bekend is dat inflammatie een belangrijke risicofactor is voor een slechter ziekteverloop van witte stof hersenschade, nemen wij deze component mee in ons model voor witte stof hersenschade.

Primaire uitkomstparameters

Primaire uitkomstparameters zijn de scores van gedragstesten (voor het meten van motoriek, cognitie, sociaal-emotioneel gedrag, en/of perifere sensibiliteit) en de mate van hersenschade (bepaald door anatomische analyses zoals histologie of *ex vivo* MRI). Secundaire uitkomstparameters omvatten o.a. concentraties van RNA/eiwitten betrokken bij hersenschade, apoptose, neuroinflammatie, oxidatief metabolisme, neuroregeneratie en neuroprotectie.

Behandelmethode

Na de inductie van HI hersenschade wordt met verschillende behandelmethoden getracht de mate van hersenschade en de gevolgen op gedrag te verminderen of te herstellen. Deze behandelmethoden zijn onderverdeeld in de volgende deelprojecten:

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)
 - A. Remmen van celdood
 - B. Remmen van inflammatie
2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neurale weefsel)
 - A. Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie
 - B. Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren

Referenties:

- Rice et al. 1981 Ann Neurol
- Nijboer et al. 2011 Ann Neurol
- Donega et al. 2013 PLoS One

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

C57/BL6 muizen of Wistar ratten worden zonder ongerief in huis gefokt. De nakomelingen ondergaan de volgende **experimentele behandeling**:

Inductie van HI hersenschade op postnatale dag P4-P9:

Diermodel 1: P7-9 HI (muis of rat)

Diermodel 2: P4-6 HI + LPS (muis)

- Inhalatieanesthesie (isofluraan, max. 10 min.) in combinatie met lokale pijnstilling (xylocaine bupivacaine)
- Inductie ischemie:
Permanente unilaterale occlusie van de a. carotis dextra, gevolgd door recovery voor minimaal 60 min in de thuishoel.
- Inductie hypoxie:
Het dier wordt eenmalig gedurende 30-140 min. blootgesteld aan 6-10% O₂, 90-94% N₂.
- Controle groep wordt sham geopereerd (geen occlusie a. carotis dextra), niet blootgesteld aan verlaagd O₂ percentage.
- In diermodel 2 krijgen de dieren aansluitend aan de HI eenmalig een intraperitoneale (i.p.) injectie met LPS (0.5-1.0 mg/kg) of PBS als vehicle (controle groep).

Gedragstesten:

De dieren worden onderworpen aan één of een combinatie van de volgende gedragstesten. Keuze van gedragstesten is afhankelijk van wetenschappelijke vraagstelling en de beoogde patiëntenpopulatie voor de behandeling. Alle gedragstesten die gebruikt worden zijn bestaande en geaccepteerde testen om de betreffende gedragingen in knaagdieren te onderzoeken. De testen zijn opgezet in samenwerking met experts op het gebied van gedragsonderzoek (o.a. [redacted]).

- Vroege motorieke ontwikkeling tijdens eerste 3 levensweken (o.a. omdraaireflex, grijpreflex, locomotor

activiteit)

- Motor functie (o.a. cilindertest, rotarod, adhesive removal test)
- Cognitie (o.a. novel object recognition, modified holeboard, T maze)
- Kernsymptomen van autisme en ADHD (o.a. social interaction test, social novelty, repetitief (poets)gedrag, open veld, locomotor activiteit)

Behandelmethode (0 tot 17 dagen na inductie HI hersenschade):

De volgende behandelmethode zullen in deze modellen worden onderzocht.

Diermodel 1:

- Eiwitten die aangrijpen op P53/JNK cascade of inflammatie (TNF α , [REDACTED]receptoren) kunnen intra-peritoneaal (i.p), intra-craniaal (i.c.) of subcutaan (s.c.) geïnjecteerd worden. In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten i.p. of s.c., tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barrière te passeren. In dat geval wordt gekozen voor i.c. injectie. (Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 1A en 1B)

Diermodel 1 en 2:

- Stamcellen of groeifactoren kunnen intra-nasaal (i.n.) of i.c. worden toegediend, afhankelijk van de onderzoeksvraag en de soort stamcellen. I.c. toediening zal worden gebruikt wanneer we een fundamentele vraag willen beantwoorden. Intra-nasale toediening zal worden gebruikt wanneer we de therapeutische eigenschappen van een groeifactor of stamcel willen onderzoeken of de nasale route willen ontrafelen van stamcellen naar plaats van schade.

I.n. toediening: max. volume 4x 3 μ l, voorafgegaan door i.n. toediening van hyaluronidase (enzym om neusslijmvlies toegankelijker te maken)

I.c. toediening: max. volume 2 μ l onder inhalatieanesthesie (isofluraan max. 5-10 min.)

Indien we geïnteresseerd zijn in het effect van stamcellen of groeifactoren op de proliferatie van endogene stamcellen in de hersenen, zal d.m.v. i.p. BrdU injecties (max 10) gekoken worden naar celdeling in het brein.

Hypothermie zal worden toegepast in experimenten die worden uitgevoerd onder doelstelling 2A.i. Hierbij worden pups blootgesteld aan een omgevingstemperatuur die zorgt voor een constante lichaamstemperatuur van 32-35°C gedurende max. 4 uur.

(Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 2A en 2B)

Randomisering en blinding

Om nest-effecten tussen groepen te voorkomen, worden binnen in één nest de pups willekeurig verdeeld over de verschillende experimentele groepen. De uitvoerend onderzoeker krijgt geblindeerde oplossingen met behandelstoffen en weet dus niet aan welke stof elke moeder of pup wordt blootgesteld (bijv. in geval van stamcellen, groeifactoren, of remmers).

Terminatie (0 dagen tot 4 maanden na inductie HI hersenschade):

Dieren worden gedood door middel van overdosis aan euthasaat. De leeftijd waarop de dieren worden gedood is afhankelijk van de wetenschappelijke vraagstelling.

Referenties:

1. Cai et al. 2011 Neurosci
2. Lin et al. 2009 Exp Neurol

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep wordt sham geopereerd (geen hersenschade), een positieve controle groep wordt blootgesteld aan HI schade en vervolgens behandeld met vehicle (wel hersenschade, geen therapeutisch effect). Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de

kwaliteit van het HI model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag (zie projectaanvraag). Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de uitkomst van een gedragstest of de mate van hersenschade (bijvoorbeeld laesie grootte). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Deze experimenten worden zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Deze keuze van diersoort is afhankelijk van de experimentele vraagstelling en beoogde behandeling. [REDACTED] 3 modellen voor hypoxisch-ischemische hersenschade [REDACTED]: (1) het model van HI hersenschade voor de voldragen pasgeborene in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies die zich uitspreiden in hippocampus, cortex en striatum (diermodel 1), terwijl (2) de HI hersenschade voor de voldragen pasgeborene in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt in voornamelijk de hippocampus (diermodel 1). (3) De HI hersenschade van het muismodel voor de te vroeg geboren baby (HI wordt vroeger geïnduceerd; tussen P4 en P6) leidt tot diffuse witte stof schade met focale laesies (diermodel 2). In de projectaanvraag is per onderzoeksvraag weergegeven wanneer voor welk model wordt gekozen.

Er is gekozen voor Wistar ratten en C57/BL6 muizen. Beide stammen worden wereldwijd gebruikt als model voor het onderzoeken van neonatale hypoxisch-ischemische hersenschade rondom de geboorte in humane pasgeborenen (d.m.v. het Vannucci-Rice model). [REDACTED] met deze modellen. Beiden diersoorten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen.

We zijn ons bewust van het feit dat een outbred rat en een inbred muis wordt gebruikt. Het Vannucci-Rice model is opgezet in de Wistar rat en de C57/BL6 muis, en dit model wordt in de literatuur dan ook voornamelijk gebruikt in deze stammen. Omdat we het belangrijk vinden dat onze resultaten vergelijkbaar zijn met de resultaten uit de literatuur, hebben we besloten voor deze experimenten de Wistar rat en de C57/BL6 muis te gebruiken.

Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

Geschatte aantallen:

Het geschatte aantal dieren per experiment is afhankelijk van het type experiment. Er zullen 3 type experimenten worden uitgevoerd:

1. Dosis-respons experiment: voor het bepalen van de meest effectieve dosis van een stof; er zullen 3 doses getest worden.
2. Therapeutisch window experiment: voor het bepalen binnen welk tijdsvenster een stof effectief is (en dus wat een optimaal behandelstip is); er zullen 3 tijdstippen getest worden.
3. Outcome experiment: voor het vergelijken van de effectiviteit van verschillende stoffen op verschillende uitkomstparameters of tijdstippen

De grootte van het gevonden relatieve effect tussen de groepen zal bij een dosis response en een therapeutisch window experiment kleiner zijn ($\pm 13\%$) dan bij een outcome experiment ($\pm 16\%$) waarbij de

optimale dosis en/of window gebruikt worden.

In de experimenten voor HI hersenschade (doelgroep 1/model 1) observeren we doorgaans een variatie van 10%. Gebruik makend van een ANOVA met Bonferroni correctie op een alfa van 5%, en met een power van 90%, betekent dit dat een groepsgrootte van 18 dieren nodig is voor een dosis-respons of therapeutisch window experiment en een groepsgrootte van 12 dieren voor een outcome experiment.

Dit betekent dat we per experiment het volgende aantal dieren nodig hebben:

Opzet dosis-respons experiment				
Exp groep	Groepen	Behandeling	Dosis	Aantal
1	SHAM			n=18
2	hersenschade	VEHICLE	hoogst equivalent	n=18
3	hersenschade	experimentele stof	dosis 1	n=18
4	hersenschade	experimentele stof	dosis 2	n=18
5	hersenschade	experimentele stof	dosis 3	n=18
Totaal aantal dieren:				90

Opzet therapeutisch window experiment				
Exp groep	Groepen	Behandeling	Start tijdstip	Aantal
1	SHAM			n=18
2	hersenschade	VEHICLE	tijdstip 1	n=18
3	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 1	n=18
4	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 2	n=18
5	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 3	n=18
Totaal aantal dieren:				90

Opzet outcome experiment			
Exp groep	Groepen	Behandeling	Aantal
1	SHAM		n=12
2	hersenschade	VEHICLE	n=12
3	hersenschade	bv experimentele stof 1	n=12
4	hersenschade	bv experimentele stof 2	n=12
5	hersenschade	bv experimentele stof 3	n=12
Totaal aantal dieren:			60

Het te verwachten maximaal aantal dierproeven en proefdieren per deelproject:

Een uitgebreid overzicht van alle uit te voeren dierproeven is weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. Tevens is weergegeven in deze tabel of dosis en/of therapeutisch window al bekend is of nog onderzocht dient te worden.

Hieronder is een beknopt overzicht weergegeven van het aantal dieren per deelproject.

NB: Het te verwachten aantal dierproeven is het mogelijk maximale aantal en is daarom gebaseerd op positieve resultaten. Indien een negatief resultaat gevonden wordt op een GO/NO GO moment, zal uiteraard een NO GO ingezet worden. Wanneer een NO GO wordt bereikt zal het totaal aantal dieren dus lager uitvallen.

Deelproject	Diermodel	Soort experiment	Aantal experimenten	Aantal muis	Aantal rat
1A	1 (Rat)	Outcome	3		180
1B	1 (Muis)	Dosis respons	3	270	
		Therap. window	6	540	
		Outcome	5	300	
	1 (Rat)	Dosis respons	2		180
		Therap. window	3		270
		Outcome	2		120
2A	1 (Muis)	Dosis respons	2	180	
		Therap. window	2	180	
		Outcome	10	600	
	2 (Muis)	Dosis respons	2	180	
		Therap. window	2	180	
		Outcome	7	420	
2B	2 (Muis)	Dosis respons	3	270	
		Therap. window	1	90	
		Outcome	3	180	
2C	1 (Muis)	Dosis respons	2	180	
		Therap. window	2	180	
		Outcome	4	240	
Totaal aantal dieren:				3990	750

Totaal aantal moeders

Voor het verkrijgen van 3990 muizen zullen bij een nestgrootte van 6 pups/nest 665 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 67 extra muizen moeders aan. Dit maakt een totaal van **732 zogende muizenmoeders**.

Voor het verkrijgen van 750 ratten zullen bij een nestgrootte van 8 pups/nest 94 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 10 extra ratten moeders aan. Dit maakt een totaal van **104 zogende rattenmoeders**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Indien beschikbaar hergebruiken we fokmoeders die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging

Het model voor HI geïnduceerde hersenschade is ontworpen om de ontwikkeling en behandeling van neonatale hersenschade te kunnen onderzoeken. Vanwege de complexe pathofysiologie van hersenschade en de grote bijdrage van andere orgaansystemen (o.a. het immuunsysteem en de bloed-hersenbarrière), is het niet mogelijk om dit gehele systeem *in vitro* na te bootsen. Daarnaast is gedrag een belangrijke

functionele uitkomstparameter, wat alleen in het levende dier gemeten kan worden.

Indien mogelijk wordt voorafgaand aan een dierexperiment de effectiviteit van een behandelmethode *in vitro* getest met behulp van neuronale of gliale celculturen. Tevens dienen deze *in vitro* systemen voor het identificeren van moleculaire en cellulaire cascades die betrokken zijn bij neuroprotectie en neuroregeneratie.

Vermindering

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk gedragsmetingen sequentieel in dezelfde dieren worden gemeten en waar mogelijk *ex vivo* MRI experimenten met histologische metingen gecombineerd worden.

Vermindering wordt ook bewerkstelligd door het inbouwen van Go/No Go keuzemomenten, zoals weergegeven in de strategie van de projectaanvraag. Hierdoor kunnen onnodige experimenten met grote groepen vermeden worden.

Verfijning

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben met dit model en de handeling zo efficiënt mogelijk kunnen uitvoeren. Daardoor worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder. Om stress te voorkomen bij de moeder, blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zwangere en zogende moeders extra tissues met kartonnen huisje of doorloop in de kooi om een nest te bouwen en zich te verschuilen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

De dieren worden in groepen gehuisvest.

Tijdens de experimentele handelingen (coagulatie a. carotis) wordt pijnbestrijding toegepast. De eerste dagen na HI inductie worden die dieren geïnspecteerd op onvoldoende drinken, groeiachterstand of immobiliteit. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in groeiachterstand of gedragsverandering, wordt besloten het dier te doden. Uit de jarenlange ervaring met dit model is gebleken dat dit in 2-3% van de dieren nodig was.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Geen wettelijk vereist onderzoek, dus n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De zwangere moeders worden in afwachting van hun bevalling enkele dagen solitair gehuisvest omdat de exacte geboortedatum van de pups moet worden vastgesteld. Standaard wordt er een shelter en tissues geplaatst in de kooi. Afhankelijk van de vraagstelling wordt extra kooiverrijking (bv. iglo met looprad) toegevoegd aan de kooi.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Om pijn tijdens de operatie (occlusie van de a. carotis dextra) te voorkomen wordt de operatie uitgevoerd onder inhalatie anesthesie met isofluraan.

Operatie wordt gestart wanneer pijnreflex afwezig is. De mate van verdoving wordt tijdens de operatie in de gaten gehouden door testen van pijnreflex en het ritme van ademhaling.

Mogelijk ondervinden de dieren pijn als gevolg van de operatie. Daarom wordt peri- en postoperatief xylocaine lokaal aangebracht op de incisie/wond.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan ten gevolge van het verstoren van de nesten en het oppakken van de dieren.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Om stress bij moeder en pups zo laag mogelijk te houden, worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder en blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zogende moeders ter beschutting van het nest extra tissues met kartonnen huisje (of mogelijk extra

kooiverrijking) in de kooi.

Om stress ten gevolge van oppakken te verkleinen, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Incidenteel zal er een pup gedurende de eerste twee dagen na de operatie teveel achterblijven in groei of niet genoeg drinken. Dit wordt waargenomen door respectievelijk een ingevallen buik of geen melk zichtbaar in de maag van de pup. Wanneer dit geobserveerd wordt, zal het dier worden gedood. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Bij experimenten waarbij de dieren >een week in leven blijven, worden de dieren wekelijks gewogen, bij achterblijven in groei en/of gewichtsafname van >20% zal het dier worden gedood.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit eerdere experimenten wordt geschat dat 2-3% van de dieren kans loopt deze criteria te halen.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Experimentele pups die sham-geopereerd worden ($\pm 20\%$): Licht

Experimentele pups die occlusie van de a. carotis dextra en hypoxia ondergaan ($\pm 80\%$): Matig

Zogende moeders: licht ongerief wegens verstoren van de nesten

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De nakomelingen worden na afloop van het experiment gedood vanwege de noodzaak om weefsels te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium. Omdat de mate van hersenschade een belangrijke uitkomstparameter is, is het doden van het dier als eindpunt voor dit experiment noodzakelijk, zodat analyses kunnen worden uitgevoerd op de hersenen.

Indien de moeders (zoals vermeld in sectie B) niet behandeld zijn, kunnen deze hergebruikt worden als fokmoeder voor volgende experimenten binnen deze projectaanvraag.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11557
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. UMC Utrecht
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 2 | Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3) |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Experimentele aanpak

In deze experimenten onderzoeken we mogelijke behandelingen voor het voorkomen of herstellen van diffuse witte stof hersenschade bij te vroeg geboren neonaten. In tegenstelling tot voldragen baby's, komt hersenschade in te vroeg geboren baby's voornamelijk voor in de witte stof (1). Inflammatie tijdens de zwangerschap is een belangrijke oorzaak van vroeggeboorte. Vervolgens kunnen de onrijpe longen van te vroeg geboren baby's leiden tot ademhalingsproblemen en zuurstoftekort. In de literatuur is bekend dat de te vroeg geboren baby's die zowel maternale inflammatie als postnatale zuurstoftekort ondervonden het meest vatbaar zijn voor diffuse witte stof schade (1, 2). Dit staat bekend als het zgn. multiple-hit model van premature witte stof schade. In dit diermodel (diermodel 3) wordt het ontstaan van diffuse witte stof hersenschade nagebootst door ratten [redacted] bloot te stellen aan [redacted] en [redacted] aan [redacted]. De combinatie van deze blootstellingen veroorzaakt microglia en astrocyt activatie, oligodendrocyt maturatie-arrest, en een verstoorde ontwikkeling van witte stof banen zonder focale laesies. Eerdere resultaten [redacted] hebben laten zien dat alleen de combinatie van beide hits, t.w. [redacted] zorgt voor verstoorde myelinisatie en schade aan de witte stof banen. [redacted] wordt veroorzaakt door het intraperitoneaal (i.p.) injecteren van [redacted]. Vervolgens worden [redacted]

Primaire uitkomstparameters

Primaire uitkomstparameters zijn de scores van gedragstesten (voor het meten van motoriek, cognitie, sociaal-emotioneel gedrag, en/of perifere sensibiliteit) en de mate van witte stof hersenschade (bepaald door histologie en/of *ex vivo* MRI). Secundaire uitkomstparameters omvatten o.a. concentraties van

RNA/eiwitten betrokken bij hersenschade, apoptose, neuroinflammatie, oxidatief metabolisme en neuroprotectie.

Behandelmethoden

Na de inductie van hersenschade wordt met verschillende behandelmethoden getracht de mate van hersenschade en de gevolgen op gedrag te verminderen of te herstellen. Deze behandelmethoden zijn onderverdeeld in de volgende deelprojecten:

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)
 - A. Remmen van celdood
 - B. Remmen van inflammatie

Referenties:

1. Volpe et al. 2003 Pediatrics
2. Eklind et al. 2001 Eur J Neurosci

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Wistar ratten worden in huis gefokt. Diffuse witte stofschade *zonder* focale laesies wordt geïnduceerd door middel van de volgende experimentele behandelingen:

- Inductie inflammatie: 2x intraperitoneale (i.p.) injectie met [REDACTED]
- De controle groepen worden geïnjecteerd met [REDACTED] in plaats van [REDACTED]

- Inductie hypoxie: Het dier wordt op [REDACTED] eenmalig gedurende [REDACTED] blootgesteld aan [REDACTED]
- De controle groep wordt niet blootgesteld aan verlaagd [REDACTED]

Gedragstesten:

De dieren worden onderworpen aan één of een combinatie van de volgende gedragstesten. Keuze van gedragstesten is afhankelijk van wetenschappelijke vraagstelling en de beoogde patiëntenpopulatie voor de behandeling. Alle gedragstesten die gebruikt worden zijn bestaande en geaccepteerde testen om de betreffende gedragingen in knaagdieren te onderzoeken. De testen zijn opgezet in samenwerking met experts op het gebied van gedragsonderzoek (o.a. [REDACTED])

- Vroege motorieke ontwikkeling tijdens eerste 3 levensweken (o.a. omdraaireflex, grijpreflex, locomotor activiteit)
- Motor functie (o.a. cilindertest, rotarod, adhesive removal test)
- Cognitie (o.a. novel object recognition, modified holeboard, T maze)
- Kernsymptomen van autisme en ADHD (o.a. social interaction test, social novelty, repetitief (poets)gedrag, open veld, locomotor activiteit)

Behandelmethoden (0 tot 72 uur na inductie hypoxie):

De volgende behandelmethoden kunnen in deze modellen worden onderzocht.

- Eiwitten die aangrijpen op P53/JNK cascade of inflammatie (TNFa, [REDACTED] receptoren) kunnen intra-peritoneaal (i.p.), intra-craniaal (i.c.) of subcutaan (s.c.) geïnjecteerd worden. In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten i.p. of s.c., tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barriere te passeren. In dat geval wordt gekozen voor i.c. injectie. (Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 1A en 1B)

Randomisering en blinding

Om nest-effecten tussen groepen te voorkomen, worden binnen in één nest de pups willekeurig verdeeld over de verschillende experimentele groepen. De uitvoerend onderzoeker krijgt geblindeerde oplossingen met behandelstoffen en weet dus niet aan welke stof elke moeder of pup wordt blootgesteld (bijv. in geval van [REDACTED] of behandeling van de pups).

Terminatie (0 dagen tot 4 maanden na inductie hypoxie):

Dieren worden gedood door middel van overdosis aan euthasaat. De leeftijd waarop de dieren worden gedood is afhankelijk van de wetenschappelijke vraagstelling.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep ondervindt geen [REDACTED] een positieve controle groep wordt blootgesteld aan zowel [REDACTED] en vervolgens behandeld met vehicle (wel hersenschade, geen therapeutisch effect). Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag. Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de uitkomst van een gedragstest of de mate van hersenschade (bijvoorbeeld met Myelin Basic Protein (MBP) als maat voor myeline verlies). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Deze experimenten worden in ratten uitgevoerd. Er is gekozen voor Wistar ratten. Deze ratten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen.

Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

Geschatte aantallen:

Het geschatte aantal dieren per experiment is afhankelijk van het type experiment. Er zullen 3 type experimenten worden uitgevoerd:

1. Dosis-respons experiment: voor het bepalen van de meest effectieve dosis van een stof; er zullen 3 doses getest worden.
2. Therapeutisch window experiment: voor het bepalen binnen welk tijdsvenster een stof effectief is en dus wat een optimaal behandelstip is); er zullen 3 tijdstippen getest worden.
3. Outcome experiment: voor het vergelijken van de effectiviteit van verschillende stoffen op verschillende uitkomstparameters of tijdstippen

De grootte van het gevonden relatieve effect tussen de groepen zal bij een dosis response en een therapeutisch window experiment kleiner zijn ($\pm 12\%$) dan bij een outcome experiment ($\pm 14\%$)

In de experimenten met dit diermodel observeren we doorgaans een variatie van 10%. Gebruik makend van een ANOVA met Bonferroni correctie op een alfa van 5%, en met een power van 90%, betekent dit dat een groepsgrootte van 21 dieren nodig is voor een dosis-respons of therapeutisch window experiment en een groepsgrootte van 16 dieren voor een outcome experiment.

Dit betekent dat we per experiment het volgende aantal dieren nodig hebben:

Opzet dosis-respons experiment				
Exp groep	Groepen	Behandeling	Dosis	Aantal
1	SHAM			n=21
2	hersenschade	VEHICLE	hoogst equivalent	n=21
3	hersenschade	experimentele stof	dosis 1	n=21
4	hersenschade	experimentele stof	dosis 2	n=21
5	hersenschade	experimentele stof	dosis 3	n=21
Totaal aantal dieren:				105

Opzet therapeutisch window experiment				
Exp groep	Groepen	Behandeling	Start tijdstip	Aantal
1	SHAM			n=21
2	hersenschade	VEHICLE	tijdstip 1	n=21
3	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 1	n=21
4	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 2	n=21
5	hersenschade	experimentele stof	tijdstip 3	n=21
Totaal aantal dieren:				105

Opzet outcome experiment			
Exp groep	Groepen	Behandeling	Aantal
1	SHAM		n=16
2	hersenschade	VEHICLE	n=16
3	hersenschade	bv experimentele stof 1	n=16
4	hersenschade	bv experimentele stof 2	n=16
5	hersenschade	bv experimentele stof 3	n=16
Totaal aantal dieren:			80

Het te verwachten maximaal aantal dierproeven en proefdieren per deelproject:

Een uitgebreid overzicht van alle uit te voeren dieproeven is weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. Tevens is weergegeven in deze tabel of dosis en/of therapeutisch window al bekend is of nog onderzocht dient te worden.

Hieronder is een beknopt overzicht weergegeven van het aantal dieren per deelproject.

NB: Het te verwachten aantal dierproeven is het mogelijk maximale aantal en is daarom gebaseerd op positieve resultaten. Indien een negatief resultaat gevonden wordt op een GO/NO GO moment, zal uiteraard een NO GO ingezet worden. Wanneer een NO GO wordt bereikt zal het totaal aantal dieren dus lager uitvallen.

Deelproject	Diermodel	Soort experiment	Aantal experimenten	Aantal rat
1A	3 (Rat)	Outcome	3	240
1B	3 (Rat)	Dosis respons	3	315
		Therap. window	6	630
		Outcome	5	400
Totaal aantal dieren:				1585

Totaal aantal moeders

Voor het verkrijgen van 1585 ratten zullen bij een nestgrootte van 8 pups/ nest 199 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 20 extra ratten moeders aan. Dit maakt een totaal van **219 zogende rattenmoeders**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Indien beschikbaar hergebruiken we fokmoeders die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging

Het model voor witte stof hersenschade is ontworpen om de ontwikkeling en behandeling van neonatale hersenschade te kunnen onderzoeken specifiek gericht op te vroeg geboren neonaten. Vanwege de complexe pathofysiologie van hersenschade en de grote bijdrage van andere orgaansystemen (o.a. het immuunsysteem en de bloed-hersenbarrière), is het niet mogelijk om dit gehele systeem *in vitro* na te bootsen. Daarnaast is functionele outcome (gedrag) een belangrijke uitkomstparameter, wat alleen in het levende dier gemeten kan worden.

Indien mogelijk wordt voorafgaand aan een dierexperiment de effectiviteit van een behandelmethode *in vitro* getest met behulp van neuronale of gliale celkweken. Tevens dienen deze *in vitro* systemen voor het identificeren van moleculaire en cellulaire cascades die betrokken zijn bij neuroprotectie en neuroregeneratie.

Vermindering

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk gedragsmetingen sequentieel in dezelfde dieren worden gemeten en waar mogelijk *ex vivo* MRI experimenten met histologische metingen gecombineerd worden.

Verfijning

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben met dit model en de handeling zo efficiënt mogelijk kunnen uitvoeren. Daardoor worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder. Om stress te voorkomen bij de moeder, blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zwangere en zogende moeders extra tissues met plastic doorloop in de kooi om een nest te bouwen.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren

medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
De dieren worden in groepen gehuisvest.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Geen wettelijk vereist onderzoek, dus n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

De zwangere moeders worden in afwachting van hun bevalling enkele dagen solitair gehuisvest omdat de exacte geboortedatum van de pups moet worden vastgesteld. Standaard wordt er een shelter en tissues geplaatst in de kooi.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Stress

- Na injectie van ██████████ kan er licht ongerief optreden (pilo-erectie). Dit verdwijnt na enkele uren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress kan ontstaan ten gevolge van het verstoren van de nesten, het scheiden van de pups en de moeder tijdens hypoxie, en het oppakken van de dieren
- Licht ongerief ontstaat na de i.p. injectie met ██████████

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Om stress bij moeder en pups zo laag mogelijk te houden, worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder en blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zogende moeders ter beschutting van het nest extra tissues met shelter in de kooi.

Om stress ten gevolge van oppakken te verkleinen, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Na blootstelling aan hypoxie kan er in een heel enkel geval onvoldoende activiteit, aanhoudende dyspnoe of tachypnoe worden waargenomen. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Incidenteel zal er een pup gedurende de eerste twee dagen na de operatie teveel achterblijven in groei of niet genoeg drinken. Dit wordt waargenomen door respectievelijk een ingevallen buik of geen melk zichtbaar in de maag van de pup. Wanneer dit geobserveerd wordt, zal het dier worden gedood. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Bij experimenten waarbij de dieren >een week in leven blijven, worden de dieren wekelijks gewogen, bij achterblijven in groei en/of gewichtsafname van >20% zal het dier worden gedood.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit onze voorgaande studies is gebleken dat in praktijk <1% van de dieren deze criteria haalt

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Pups blootgesteld aan ██████████ matig
Controle pups (██████████) (± 20%): licht
██████████ blootgesteld aan lage dosis ██████████ licht
██████████ blootgesteld aan vehicle: licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De nakomelingen worden na afloop van het experiment gedood vanwege de noodzaak om weefsels te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium. Omdat de mate van hersenschade een belangrijke uitkomstparameter is, is het doden van het dier als eindpunt voor dit experiment noodzakelijk, zodat analyses kunnen worden uitgevoerd op de hersenen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11557	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	3	Neuronale en gliale cellen voor primaire celweek

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Met behulp van primaire celweek kunnen we mechanistische vragen beantwoorden over de complexe interactie tussen verschillende cellen die betrokken zijn bij het ontstaan van hersenschade en kunnen we de effecten van verschillende compounds testen op inflammatoire en apoptotische cascades. Voor deze *in vitro* testen worden neuronen, microglia, oligodendrocyten en astrocyten geïsoleerd uit weefsel van embryonale of neonatale ratten of muizen. Na isolatie van de neurale cellen onderzoeken we in het lab hoe deze cellen reageren op verschillende stimuli (o.a. inflammatiefactoren, excitotoxiciteit, oxidatieve stress) en of we processen zoals apoptose, proliferatie, differentiatie, en inflammatie kunnen beïnvloeden door blootstelling aan potentiële therapeutische compounds. Dit wordt gedaan aan de hand van morfologische inspectie, immunofluorescente kleuringen, en bepaling van RNA/eiwitconcentraties.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

C57/BL6 muizen of Wistar ratten worden zonder ongerief in huis gefokt. De nakomelingen ondergaan de volgende **experimentele behandeling**:

Tussen embryonale dag E14 en postnatale dag P10 worden embryo's of pups geëuthanaseerd met een overdosis euthasaat, waarna de hersenen worden geïsoleerd. De dag van terminatie is afhankelijk van het celtype dat geïsoleerd wordt. De embryo's of pups ondergaan verder geen experimentele handelingen.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen in de *in vitro* experimenten. In de negatieve controle groep worden cellen blootgesteld aan vehicle/medium waarin de stimuli worden opgelost. Daarnaast wordt een

positieve controle groep meegenomen waarin cellen worden blootgesteld aan de gewenste stimulus/stimuli en vervolgens behandeld met de vehicle-oplossing waarin de potentiële therapeutische component is opgelost. Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het *in vitro* model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag. Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de mate van cel differentiatie (bijvoorbeeld expressie van myeline door oligodendrocyten). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

Een voorbeeld van de groepen in een *in vitro* proef ziet er als volgt uit:

	Veh	█	█	█	█	█	█	█
Ongedifferentieerde OGD + Veh	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6
Ongedifferentieerde OGD + █	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6
Gedifferentieerde OGD + Veh	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6
Gedifferentieerde OGD + █	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6	N=6

In dit voorbeeld worden het effect van 8 verschillende stimuli (gericht op inflammatie of oxidatieve stress) getest op de differentiatie-capaciteit van pre-oligodendrocyten (OGD). Daarnaast wordt getest of █ een potentieel therapeutische component in staat is differentiatie te bevorderen in een omgeving van inflammatie of oxidatieve stress.

In dit type experimenten wordt het totaal aantal breinen die nodig zijn voor één experiment gezamenlijk gehomogeniseerd en opgewerkt tot één pool van cellen. Deze pool van cellen wordt vervolgens verdeeld over de verschillende wellen. Omdat de cellen uit één pool komen, betekent dit dat alle welletjes dezelfde soort cellen bevatten van dezelfde dieren en er dus geen diervariatie aanwezig is, noch tussen de wellen, noch tussen de groepen.

Voor de poweranalyse wordt gebruik gemaakt van de tweezijdige ongepaarde t-toets een variatie van 5% en een aan te tonen relatief effect van 12%. Doorgaans worden er in één experiment ± 10 vergelijkingen gemaakt, wat zorgt voor een alfa van $0.05/10=0.005$. Met een power van 90% betekent dit dat er een groepsgrootte van 6 welletjes nodig is om het te verwachten verschil statistisch te detecteren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Deze experimenten worden zowel met muizen als met ratten weefsels uitgevoerd. Deze keuze van diersoort is afhankelijk van de experimentele vraagstelling en de beoogde potentiële therapeutische componenten. Er is gekozen voor Sprague Dawley ratten en C57/BL6 muizen. Beide stammen worden wereldwijd gebruikt als *in vitro* model voor het isoleren en kweken van de desbetreffende celtypen als model voor neonatale hersenschade. █ heeft jarenlange ervaring met het isoleren van neurale cellen uit beide diersoorten. Beiden diersoorten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen. Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

We zijn bewust van het feit dat we in deze experimenten Sprague Dawley ratten gebruiken, terwijl de experimenten uit bijlage I en II worden uitgevoerd in Wistar ratten. De reden hiervoor, is dat het protocol voor neurale celisolatie is overgenomen uit het bekende Nature Protocol artikel van Chen et al. (1). Omdat

dit protocol wereldwijd wordt gebruikt met cellen uit Sprague Dawley ratten, en wij het belangrijk vinden dat onze resultaten vergelijkbaar zijn met de resultaten uit de literatuur, hebben we besloten voor deze experimenten Sprague Dawley ratten te gebruiken.

Uit eerdere experimenten weten we dat we uit 10 breintjes voldoende cellen kunnen isoleren voor 1 *in vitro* experiment van 50-100 welletjes van de desbetreffende cellen. Om alle *in vitro* vragen te kunnen beantwoorden in deze projectaanvraag, verwachten de komende jaren per jaar 10 *in vitro* experimenten uit te voeren met muizen en 10 experimenten met ratten, waarvan elk 9 met pups en 1 met embryo's. Om deze experimenten uit te voeren zijn voor 5 jaar: 9 experimenten x 10 pups x 5 jaar = **450 muizenpups en 450 rattenpups nodig**. Daarnaast zijn voor deze experimenten: 1 experimenten x 10 embryo's x 5 jaar = **50 muizenembryo's en 50 rattenembryo's nodig**.

Deze dieren zullen gefokt worden op lopende fokprotocollen voor muis en rat binnen onze onderzoeksgroep. Wanneer embryo's worden gebruikt, wordt tevens de moeder gedood. Dit betekent dat voor deze experimenten ook moeders worden aangevraagd:

Een drachtige muis draagt gemiddeld 6 pups, er dus zijn $50 / 6 = 9$ moedermuizen nodig. Aangezien 10 % van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, zijn er in totaal **10 zogende moedermuizen** nodig.

Een drachtige rat draagt gemiddeld 8 pups, er dus zijn $50 / 8 = 7$ moederratten nodig. Aangezien 10 % van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, zijn er in totaal **8 zogende moederratten** nodig.

Referenties:

1. Chen et al. 2007 Nature Protocols

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Indien beschikbaar hergebruiken we moeders voor fok die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging:

Onsterfelijke neuronale of gliale cellijnen zijn beschikbaar, maar verschillen te veel van primair geïsoleerde neuronen, oligodendrocyten, astrocyten en microglia. Verkregen resultaten op basis van deze cellijnen zijn dus moeilijk te transleren naar de functie van de respectieve celtypes zoals deze aanwezig zijn in het organisme.

In deze studie worden cellen geïsoleerd uit het brein van rattenpups en muizenpups en deze worden vervolgens in kweek gezet. De dieren zelf ondergaan geen experimentele handelingen. Deze *ex vivo* methode zal onder andere worden gebruikt om potentiële therapieën te selecteren voordat de teststoffen getest worden in langdurige *in vivo* experimenten. Door het vervangen van lange *in vivo* studies met deze *ex vivo* methode, ondergaan de dieren minder ongerief.

Vermindering:

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk celtypes gecombineerd geïsoleerd worden waar mogelijk, bv een gemengde glia kweek met microglia en oligodendrocyten.

Verfijning:

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben. De zwangere en zogende moeders krijgen extra tissues met kartonnen huisje/shelter in de kooi om een nest te bouwen. De pups worden als geheel nest uit de kooi gehaald bij opoffering zodat de moeder niet meerdere malen stress ondervindt van het weghalen van enkele pups.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de handelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren (nest ineens weghalen). De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

De dieren worden zoveel mogelijk in groepen gehuisvest.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De pups worden in 1x uit het nest gehaald, zodat meerdere verstoringen voorkomen worden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De nakomelingen worden geofferd omdat de hersenen geogst worden om de celkweken te kunnen inzetten.

Indien de moeders (zoals vermeld in sectie B) niet gedood worden voor embryonale celkweken, kunnen deze hergebruikt worden als fokmoeder voor volgende experimenten binnen deze projectaanvraag.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.I.557.009
2. Titel van het project : Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein
3. Titel van de NTS : Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : DEC-Utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 23-05-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 01-06-2016, 17-08-2016, 07-09-2016 en 11-02-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 07-06-2016/04-08-2016, 23-08-2016/07-09-2016 en 13-10-2016/21-10-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 14-11-2016

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-09-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: vo art.9 onderzoeker + art. 9 onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

De DEC wil graag meer achtergrond, waarin de hypothesen genoemd worden met betrekking tot de therapeutische ingrepen; wat gaan de onderzoekers doen en waarom. Ook leest de DEC graag wat over mogelijke consequenties van de therapieën later in het leven. De DEC heeft wat twijfels over verschillende therapieën, dus vindt het belangrijk dat deze goed beargumenteerd worden. Als voorbeeld noemt de DEC de [REDACTED]; de literatuur is hier zeer terughoudend over. De onderzoeker reageert met het feit dat er in [REDACTED] [REDACTED] veel onderzoek is verricht met betrekking tot [REDACTED] en dat [REDACTED] zich niet kan

vinden in de stelling dat remming onverstandig is. De DEC verzoekt haar dit goed te beargumenteren in de aanvraag, ondersteund met literatuur.

Met betrekking tot de doses van de te gebruiken stoffen, moet worden aangegeven of al bekend is wat de juiste dosis is. Dit moet goed toegelicht worden. Mocht de juiste dosis niet bekend zijn, dan moet er een dose-finding-studie ingepland worden, met de bijbehorende dieren. Dit moet ook terug te vinden zijn in de bijlagen. De onderzoekers zullen hiernaar kijken.

De DEC geeft de onderzoekers de overweging mee om het project niet te breed op te schrijven, omdat er anders teveel tekst in de aanvraag komt, wat het moeilijk leesbaar maakt. Onderzoekers geven aan bereid te zijn om de aanvraag op te delen in meerdere aanvragen, als dit het voor de DEC makkelijker te beoordelen maakt. Om deze keuze te maken, is het volgens de DEC echter belangrijk om te bedenken en te benoemen hoe afhankelijk de verschillende deelprojecten van elkaar zijn. Tevens is het belangrijk om niet teveel go/no go-momenten te hebben, omdat dit het project ontoetsbaar kan maken. De go/no go-momenten moeten in elk geval allemaal duidelijk beschreven worden, waarbij het aantal dieren gebaseerd wordt op alle go's. De DEC raadt aan om alleen go/no go-momenten te hanteren die gebaseerd zijn op de hypothesen en niet op zaken daarbuiten die mis kunnen gaan. De DEC laat de onderzoekers vrij in hun keuze om de aanvraag al dan niet op te splitsen.

Tenslotte moet in de bijlagen duidelijk worden gemaakt waar het maximaal aantal proefdieren per onderdeel op gebaseerd is.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 07-06-2016
- Datum antwoord: 04-08-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC verzoekt u kort toe te lichten om wat voor een operatie het hier gaat.
In de NTS is de operatie kort toegelicht: "... Als gevolg van de operatie, waarbij de halsslagader eenzijdig wordt afgesloten, kunnen de dieren kortdurend pijn ondervinden..."

Projectvoorstel

- Algemene opmerking: Het projectvoorstel heeft in de huidige format alle kenmerken van een programma in plaats van een project (een programma omvat doorgaans meerdere projecten en heeft een doel dat op een hoger abstractieniveau ligt, terwijl een project een concretere onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd beoogd resultaat). De aanvraag beschrijft eigenlijk een heel onderzoeksgebied: u richt zich op het ontstaan van neonatale hersenschade en op bescherming en regeneratie van het hersenweefsel. Al het onderzoek op dit terrein zou in

de komende vijf jaar door u onder deze projectvergunning uitgevoerd kunnen worden. Uw aanvraag is op zichzelf een heldere beschrijving van het onderzoeksterrein waarop u de afgelopen jaren heeft gewerkt en waarop ook na de komende 5 jaar nog door u gewerkt zal worden. Op die manier wordt het voor de DEC echter niet helder wat de onderzoeksvragen zijn die u de komende 5 jaar wenst te beantwoorden. De DEC wijst u erop dat er alleen vergunningen verleend kunnen worden voor projectaanvragen waarbij een ethisch verantwoorde schade baten analyse gemaakt kan worden (dit is in het geval van een programma niet goed mogelijk). De DEC raadt u aan om in het projectgedeelte van de aanvraag (niet in de bijlages) concreter te worden over de projecten die schuilgaan achter deze aanvraag (en de daaraan gekoppelde onderzoeksvragen). Van belang is ook dat duidelijker wordt wat uw concrete doelstellingen zijn voor de komende vijf jaar. Welke belangrijke stappen wilt u in die vijf jaar zetten? De te volgen strategie dient daar logisch bij aan te sluiten en de rol van de voorgestelde dierproeven in die strategie dient helder te zijn. De DEC verzoekt u daarnaast ook specifieker aan te geven welke stoffen gebruikt zullen worden. De DEC ziet uw herschreven projectvoorstel graag tegemoet.

1. Welke deelprojecten gaan schuil?

De projectaanvraag is in grote mate aangepast naar aanleiding van de opmerkingen van de DEC. In sectie 3.1 Achtergrond is het onderdeel "Onderverdeling van de projectaanvraag" toegevoegd, en is het project verdeeld in 5 verschillende deelprojecten (1A,B en 2A-C), gebaseerd op 5 verschillende behandelmethoden.

2. Welke doelstelling en onderzoeksvragen horen bij deze projecten?

In sectie 3.2 Doel is per deelproject de doelstellingen omschreven en bijbehorende onderzoeksvragen benoemd. Daarbij is specifiek aangegeven wat voor soort stoffen of cellen getest zullen worden.

3. Laat de strategie logisch aansluiten op deze projecten

In sectie 3.4.1 is de algemene opzet van het project verhelderd door in 4 stappen weer te geven welke gedachtegang gevolgd wordt bij het opzetten van een dierproef. In sectie 3.4.1 en 3.4.2 zijn de 3 diermodellen beschreven die gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en is in detail beschreven welk diermodel zal worden gebruikt voor welk deelproject. In sectie 3.4.3 is de strategie per deelproject in schema's weergegeven met ingebouwde Go/NoGo momenten.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De ratio voor het gebruik van een infectie geïnduceerd LPS-model is de DEC niet helder. Waarom is niet gekozen voor, bijvoorbeeld, een heatstress-model? Graag verhelderen.
Voor te vroeg geboren kinderen is bekend dat maternale en postnatale inflammatie zeer belangrijke risicofactoren zijn voor het ontstaan van en een slechter ziekteverloop van witte stof hersenschade. Omdat inflammatie een belangrijke component is in het ontstaan of beloop van neonatale hersenschade, is het klinisch zeer relevant om naast zuurstof tekort als causale factor ook inflammatie als causale factor mee te nemen in ons onderzoek. Deze informatie staat nu vermeld in zowel de 3.1 Achtergrond als 3.4 Onderzoeksstrategie.

Omdat niet bekend is dat hitte-stress een belangrijke risicofactor is voor neonatale hersenschade, vinden wij het heat-stress model geen translationeel model voor het onderzoeken van neonatale hersenschade. Als gevolg van sepsis kan hitte-stress aanwezig zijn, maar dan is het daadwerkelijk induceren van sepsis/perifere inflammatie naar onze mening beter te transleren naar de klinische situatie dan blootstelling aan alleen hitte.

Bijlage 2

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Klopt het dat alle [REDACTED] [REDACTED] krijgen en alle pups [REDACTED] Graag duidelijker weergeven in het projectvoorstel.
Nee, de controle groepen worden niet blootgesteld aan [REDACTED] en ook niet aan [REDACTED]. Onder het kopje [REDACTED] staat: "De controle groepen worden geïnjecteerd met [REDACTED] in plaats van [REDACTED]." Onder het kopje nakomelingen staat: "De controle groep wordt niet blootgesteld aan [REDACTED] [REDACTED]"
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Bij vermindering geeft u aan dat er MRI experimenten worden uitgevoerd, maar dat lijkt niet het geval, of het zou net als in bijlage 1 om ex vivo MRI onderzoek moeten gaan. Graag verhelderen/verwijderen. Dit geldt ook voor bijlage 1, punt D, vermindering en bijlage 2 punt A.
Inderdaad gaat het om ex vivo MRI, dit is nu helder vermeld in zowel bijlage 1 als 2.

Bijlage 3

- B. De dieren: De DEC raadt u aan nogmaals te kijken naar welke embryo's wel en welke niet moeten worden meegeteld (vanaf E19 meetellen). Eventueel kunt u hiervoor contact opnemen met de IvD voor nader overleg.
Na overleg met IvD blijkt dat volgens de Wet op de dierproeven alle handelingen aan "foetale vormen van zoogdieren vanaf het laatste derde deel van hun normale ontwikkeling" beschouwd worden als dierproeven. Aangezien wij geen embyo's gebruiken voor E14-E15, rekenen we alle embryo's mee in de telling. De telling van bijlage III is dan ook niet veranderd t.o.v. de vorige versie.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum vragen: 23-08-2016
- Datum antwoord: n.v.t.
- Opmerking DEC + uitnodiging gesprek:
De DEC is van mening dat uw projectvoorstel op een te hoog aggregatieniveau is geschreven, waardoor bepaalde informatie – nodig om een navolgbare ethische afweging te kunnen maken – ontbreekt. De DEC moet bijvoorbeeld kunnen beoordelen of het aantal benodigde dieren en het te verwachten ongerief realistisch zijn ingeschat. Verder mist de DEC in het projectvoorstel een nadere onderbouwing en uitwerking van de therapeutische interventies en van de theoretische achtergronden daarvan. Wat zijn uw hypotheses met

betrekking tot die interventies en waar zijn die op gebaseerd? De DEC zou graag met u van gedachten wisselen over hoe het projectvoorstel het beste opgezet kan worden.

- Datum vragen: 13-09-2016
- Datum antwoord: 21-10-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemeen: Hoewel de DEC op verschillende plaatsen graag meer achtergrondinformatie zou zien, is het niet te bedoeling dat de aanvraag, in verband met de leesbaarheid, teveel tekst gaat bevatten. De DEC heeft u ter overweging meegegeven om de aanvraag op te delen in meerdere kleine aanvragen. Het zou de toetsbaarheid kunnen bevorderen, de DEC heeft echter geen uitgesproken voorkeur. Graag uw reactie.

Wij zijn van mening dat het uit elkaar trekken van deze projectaanvraag niet zal leiden tot een betere leesbaarheid en beter begrip van de opgezette studies. Deze projectaanvraag bevat dezelfde informatie als de opgedeelde aanvragen zouden bevatten. Daarnaast hebben alle studies een overeenkomstig doel voor ogen: het beschermen of herstellen van de beschadigde hersenen in de pasgeborene. Alle in deze projectaanvraag beschreven experimenten vallen binnen dit overkoepelende doel. Er is dermate veel samenhang tussen de onderlinge deelprojecten, diermodellen en vraagstellingen, dat het in onze ogen overzichtelijker is om de beschreven deelprojecten tezamen onder één projectaanvraag in te dienen.

- 3.1 Achtergrond: Met betrekking tot de therapeutische ingrepen, acht de DEC het essentieel dat deze onderbouwd worden met hypothesen aangaande het veronderstelde werkingsmechanisme. Graag aanpassen.

We zijn het erover eens dat er bij sommige gedeelten onvoldoende onderbouwing was van de mogelijke werkzaamheid van sommige therapeutische ingrepen, met name wat betreft P53 remmers, stamceltherapie, en het [REDACTED]. Deze informatie is toegevoegd aan 3.1 Achtergrond, waarbij zoveel mogelijk eerder [REDACTED] resultaten [REDACTED] of resultaten uit de literatuur, die essentieel kunnen zijn voor het begrip van de onderzoeksvragen, in beknopte vorm worden besproken. Denk hierbij aan werkingsmechanismen, doses, windows e.d. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt. Tevens zijn bij de go/no go figuren (3.4.3.) nogmaals de hypothesen per deelproject opgenomen ter verduidelijking.

- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u informatie op te nemen in uw aanvraag met betrekking tot mogelijke consequenties op de lange termijn van de door u gekozen behandelingen. Graag onderbouwen met literatuur en deze kort beschrijven.

De mogelijk consequenties op lange termijn en veiligheidsaspecten, met name van de [REDACTED] [REDACTED] zijn nu kort beschreven en onderbouwd met [REDACTED] [REDACTED] en literatuur in 3.1 Achtergrond. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u alle go/no go-momenten duidelijk te baseren op de door u geformuleerde hypotheses.
In onderdeel 3.4.3. zijn de go/no go figuren per deelproject aangepast en verduidelijkt. Tevens hebben we per deelproject nogmaals de bijbehorende hypotheses opgenomen in deze figuren ter verduidelijking.

Bijlagen algemeen

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Graag per stof beschrijven of al bekend is wat de juiste dosis is. Voor de stoffen waarvan dit niet bekend is, moet er een dose-finding studie ingepland en beschreven worden, inclusief het daarvoor benodigde aantal dieren. Graag aanpassen. Licht ook de stamceltherapie uitvoeriger toe (herkomst van de cellen, de bewerking die ze ondergaan). Is weliswaar niet de dierproef, maar deze informatie draagt wel bij aan het waarderen van het experiment.
Wij hebben ter verduidelijking van de gehele projectaanvraag figuur 3 opgenomen aan het einde van het Projectvoorstel. Deze tabel bevat alle informatie per deelproject over het al dan niet bekend zijn van dosis en therapeutisch window van de te testen strategie, en dus tevens of een dosis-response- of therapeutisch window-studie nog uitgevoerd zal moeten worden. Tevens wordt het uit deze figuur 3 duidelijk welk diermodel gebruikt zal worden voor het deelproject. Vervolgens hebben wij in tabelvorm in bijlagen 3.1 en 3.2 (onderdeel B. de dieren) beschreven hoeveel dieren nodig zullen zijn per experiment-vorm en in totaal per deelproject. Wij zijn van mening dat deze tabellen in de bijlagen samen met figuur 3 in het Projectvoorstel, de benodigde dieraantallen zeer inzichtelijk maken.
Toelichting stamceltherapie: Zoals gewenst door de DEC hebben wij in het Projectvoorstel onder onderdeel 3.4.1., stap 3, meer informatie opgenomen over de stamcellen wat betreft herkomst, karakterisatie en kweekcondities. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt.
 - B. De dieren: De DEC verzoekt u het aantal dieren overal zo mogelijk te onderbouwen met een statistische berekening. Graag toevoegen.
Zie ook ons antwoord hierboven bij Bijlagen algemeen-A. Wij hebben ter verduidelijking figuur 3 opgenomen aan het einde van het Projectvoorstel. In bijlagen 3.1 en 3.2 (onderdeel B. de dieren) zijn tevens statistische berekeningen opgenomen per experiment-vorm (t.w. dosis-respons-, therapeutisch window- of outcome-experiment). De informatie in deze tabellen laat zien hoeveel dieren nodig zullen zijn per experiment-vorm en in totaal per deelproject.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:

- Datum expert advies:
- Advies expert:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en de beschreven deelprojecten en sub-deelprojecten vertonen een duidelijke samenhang. Hersenschade in pasgeboren baby's is een ernstig klinisch probleem met levenslange consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. In de kliniek worden twee belangrijke patiëntengroepen onderscheiden op basis van hun ontwikkelingsfase: de voldragen baby's met acute hersenschade als gevolg van zuurstofgebrek bij de geboorte en de te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof hersenschade met of zonder focale laesies. Voor beide patiënten groepen zijn momenteel, afgezien van de gebruikte acute hypothermie (koeling) voor voldragen baby's met ernstige acute hersenschade, geen therapieën beschikbaar. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling gericht op het in kaart brengen, middels dierexperimenteel onderzoek, van de pathofysiologie van genoemde typen hersenschade bij pasgeboren baby's en op onderzoek naar mogelijke nieuwe therapieën voor deze patiënt-doelgroepen.

Hersenschade bij het pasgeboren kind wordt in veel gevallen veroorzaakt door neonatale hypoxie-ischemie (HI). HI is een conditie van verlaagde zuurstofvoorziening (hypoxie) en doorbloeding (ischemie) in de organen, waaronder de hersenen. Door een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen (o.a. glucose), en een ophoping van afvalstoffen kan een HI-insult in de hersenen weefselschade veroorzaken. Het tekort aan zuurstof en glucose veroorzaakt verhoogde membraan depolarisatie en verstoorde ATP- afhankelijke glutamaat heropname vanuit de synapsspleet. Glutamaat excitotoxiciteit (=overstimulatie van glutamaat receptoren) kan leiden tot celdood van neuronen en oligodendrocyten (gliacellen die myeline maken), onder andere via de productie van vrije radicalen zoals stikstofoxide. Deze cascade activeert tevens de andere gliacellen in de hersenen, te weten microglia en astrocyten, wat leidt tot een inflammatoire respons op de plaats van het insult. Inflammatie, zowel in de hersenen als systemisch, veroorzaakt meer neuronale celdood en uiteindelijk meer weefselschade. Er worden drie patiënt-doelgroepen onderscheiden:

1. Voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie ("vertaald" in Diermodel 1).
2. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte-stofschade met focale laesies (Diermodel 2).
3. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte-stofschade zonder focale laesies (Diermodel 3).

Het project wordt onderverdeeld in twee deelprojecten:

1. Neuroprotectie
 - a) Remmen van celdood.
 - b) Remmen van inflammatie.
2. Neuroregeneratie
 - c) Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie.
 - d) Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren.
 - e) ██████████.

Bovenstaande deelprojecten en sub-deelprojecten resulteren in een omvangrijk project. De opzet is echter zeer transparant met duidelijke deelvragen die men d.m.v. goed opgezette dierexperimenten zal trachten te beantwoorden. De onderzoekstrategie is helder. De te testen therapeutische interventies berusten of op eerdere onderzoeksresultaten, of op gefundeerde hypothesen omtrent het werkingsmechanisme.

De DEC Utrecht is daarom van mening dat deze aanvraag toetsbaar is vanwege de transparantie en samenhang tussen de onderdelen.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van deze aanvraag is het in kaart brengen van de pathofysiologie van verschillende typen hersenschade bij pasgeboren proefdieren en onderzoek naar mogelijke nieuwe therapieën om de schade te beperken en/of te herstellen. Het uiteindelijke doel is hersenschade, acuut dan wel als gevolg van vroeggeboorte en/of infecties bij pasgeboren baby's te voorkomen of te herstellen. Het betreft hier een fundamenteel onderzoek, echter wel met een duidelijk translationeel en toegepast perspectief. De DEC Utrecht twijfelt niet aan de sterke relatie tussen het directe en uiteindelijke doel.
5. Wereldwijd ondervinden 1.15 miljoen pasgeboren baby's (8.5 per 1000 levend geboren) een hypoxie-ischemie (HI) insult, wat in 25% van de gevallen leidt tot peri- of postnatale sterfte (jaarlijks 287.000 levend geboren). Van de pasgeboren baby's die het HI-insult overleven ontwikkelt 35% permanente neurologische afwijkingen. Jaarlijks betreft dit naar schatting 414.000 pasgeboren baby's. De eerste belanghebbenden zijn dus pasgeborenen die een gereede kans hebben om hersenschade op te lopen met levenslange negatieve consequenties voor hun gezondheid en maatschappelijk functioneren. Dit onderzoek kan er toe bijdragen dat in te toekomst die hersenschade met meer succes dan nu voorkomen of hersteld kan worden. De gebruikte proefdieren hebben er belang bij om gevrijwaard te blijven dan de aantasting van hun welzijn en integriteit die gepaard gaat met dit onderzoek. Hun integriteit wordt per definitie aangetast omdat ze als proefdier geen leven kunnen leiden in een voor de soort geëigende

natuurlijke omgeving. Ook is het opzettelijk aanbrengen van hersenschade een aantasting van hun integriteit. Hun welzijn zal worden aangetast doordat ze stress en pijn ondervinden als gevolg van de experimenten, een aantal zal niet geboren kunnen worden en tenslotte zullen ze allemaal gedood worden. Het kennisreservoir m.b.t. tot hersenschade bij baby's als gevolg van vroeggeboorte en/of infectie, of als gevolg van een geboortetrauma, evenals de ontwikkeling van mogelijk therapieën om hersenschade te voorkomen, dan wel te herstellen zal door dit onderzoek verder gevoed worden. Deze kennis is van groot belang voor voortgang in dit onderzoeksveld. De onderzoekers hebben ook zelf belang bij dit onderzoek, omdat publicatie van aansprekende resultaten (nieuwe wetenschappelijke inzichten) kan leiden tot nieuw- of vervolgonderzoek [REDACTED]

[REDACTED]. Carrière mogelijkheden en commerciële belangen dienen naar de mening van de DEC Utrecht echter geen rol te spelen in de ethische afweging betreffende de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De DEC Utrecht is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC Utrecht is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Onderdeel 3.4 van de projectbeschrijving geeft een uitgebreide en transparante beschrijving van de onderzoeksstrategie. De primaire uitkomstparameters volgen uit 1) cognitieve en motorieke gedragsexperimenten zonder bijkomend ongerief, en 2) anatomische en biochemische analyses van de hersenen voor het bepalen van de mate van hersenschade of herstel daarvan. Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden dieren op een tijdstip tussen de 0 dagen en 4 maanden gedood met een overdosis pentobarbital voor verdere analyse van weefsels. Op cruciale stadia van het onderzoek zijn go-no go beslissingen opgenomen, waardoor onnodig proefdiergebruik, wordt voorkomen. Naar aanleiding van deze informatie is de DEC Utrecht van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen, de te gebruiken diermodellen goed beargumenteerd zijn binnen het kader van de vraagstelling en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.

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: buit instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht tot matig. De dieren ondergaan zo nodig (zie bijlage 1 en 2) een operatie om occlusie van de arteria carotis dextra en hypoxia te bewerkstelligen. In bijlage 3 wordt het gebruik van dieren beschreven waarbij hersenweefsel verzameld wordt voor de *in vitro* kweek van diverse neuronale elementen die gebruikt zullen worden voor *in vitro* onderzoek naar de effecten van therapeutische ingrepen dat vooraf zal gaan aan de *in vivo* experimenten.
- Bijlage 1
Omvat 3990 muizen en 750 ratten. Dit zijn allemaal jonge pups, dan wel embryo's. Voor de fok daarvan zijn 732 zogende muizenmoeders nodig en 104 rattenmoeders. Ongerief: experimentele pups die sham-geopereerd worden ($\pm 20\%$): licht. Experimentele pups die occlusie van de a. carotis dextra en hypoxia ondergaan ($\pm 80\%$): matig. Zogende moeders: licht ongerief wegens verstoring van de nesten. Gedragstesten, alle dieren: licht.
- Bijlage 2
Omvat 1585 rattenpups, waarvoor 219 rattenmoeders nodig zijn. Ongerief: pups blootgesteld aan [REDACTED] ($\pm 80\%$): matig. Controle pups [REDACTED] ($\pm 20\%$): licht. [REDACTED] blootgesteld aan lage dosis [REDACTED] licht [REDACTED] blootgesteld aan [REDACTED] licht. Gedragstesten alle pups: licht. Toediening therapeutica: licht of matig, afhankelijk van de wijze van toediening.
- Bijlage 3
500 rattenpups en 500 muizenpups: Dieren worden geëuthanaseerd tussen embryonale dag E14 en postnatale dag P10 ten behoeve van *in vitro* experimenten: 100 % licht ongerief.
12. De integriteit van een groot deel van de gebruikte dieren wordt aangetast door het opzettelijk veroorzaken van hersenschade. Dit heeft een negatieve invloed op hun gedrag en

zelfredzaamheid en hun mogelijkheden om zich tot een normaal functionerende, volwassen muis te ontwikkelen.

13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Als gevolg van de operatie kan een gering percentage van de pups (1-3%) in groei achterblijven. Door de dieren regelmatig te monitoren kunnen deze achterblijvers tijdig uit het experiment worden genomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand aan therapeutische ingrepen worden in bijlage 3 *in vitro* experimenten beschreven welke gericht zijn op de gevolgen van hypoxie voor diverse typen van hersencellen en de effecten van therapeutische ingrepen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC Utrecht is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel t.o.v. de gekozen strategie en looptijd. Het in bijlage 3 beschreven *in vitro* onderzoek betekent een reductie van het aantal proefdieren dat ingezet zal worden voor het testen van therapeutische ingrepen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd door ervaren medewerkers en er wordt adequate post-operatieve pijnstilling toegepast. Na de operaties vindt voldoende monitoring plaats en de humane eindpunten zijn goed geformuleerd.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Aan het einde van ieder experiment worden de dieren gedood op een wijze zoals toegestaan in de richtlijn. Het doden is noodzakelijk om post-mortem onderzoek aan de hersenen te kunnen verrichten.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen en ratten worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek naar de pathofysiologie van verschillende typen hersenschade bij pasgeborenen en naar mogelijke nieuwe therapieën om de schade te beperken en/of te herstellen de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. De eerste belanghebbenden zijn dus pasgeborenen die een gereede kans hebben om hersenschade op te lopen met levenslange negatieve consequenties voor hun gezondheid en maatschappelijk functioneren. Neurologische afwijkingen beïnvloeden niet alleen de patiënten die het betreft, maar hebben ook consequenties voor hun naaste omgeving en de maatschappij als geheel. De DEC Utrecht kent hier zeer veel gewicht aan toe.
De gebruikte proefdieren hebben er belang bij om gevrijwaard te blijven dan de aantasting van hun welzijn en integriteit die gepaard gaat met dit onderzoek. Hun integriteit wordt per definitie aangetast omdat ze als proefdier geen leven kunnen leiden in een voor de soort geëigende natuurlijke omgeving. Ook is het opzettelijk aanbrengen van hersenschade een aantasting van hun integriteit. Hun welzijn zal worden aangetast doordat ze stress en pijn ondervinden als gevolg van de experimenten, een aantal zal niet geboren kunnen worden en tenslotte zullen ze allemaal gedood worden. Dit alles kan niet anders gekwalificeerd worden dan als een groot nadeel dat veel gewicht toekomt in de ethische afweging. De ernst van de welzijnsaantasting is niet meer dan matig, maar de combinatie met de aantasting van de integriteit door het opzettelijk aanbrengen van hersenschade maakt dat de commissie toch van een groot nadeel spreekt.
Het kennisreservoir m.b.t. tot hersenschade bij baby's zal door dit onderzoek verder gevoed worden. Wetenschappelijk en klinisch is dit van substantiële waarde.
[REDACTED]
[REDACTED] Noch dit commerciële belang, noch het belang van de onderzoeker (welvaart, carrière) dient naar de mening van de DEC Utrecht geen rol te spelen in deze afweging.
De DEC Utrecht is van mening dat het belang van het vergroten van de kennis over hersenschade bij pasgeborenen, en over behandelingen die dat kunnen voorkomen of herstellen, zeer zwaarwegend is. Het betreft grote aantallen kinderen voor wie het uiteindelijke doel, het beschikbaar komen van adequate therapieën, van zeer groot belang is voor de kwaliteit van hun verdere leven. De commissie meent dat de belangen van de pasgeborenen met hersenschade dermate zwaar wegen dat ze de aanzienlijke schade voor de proefdieren in dit geval kunnen rechtvaardigen.
3. Gegeven hetgeen bovenstaand onder C4, C5, C7, C8, C9-11, C14-18, C10-13 en C19 is opgemerkt, en de waardering, c.q. kwalificatie die de DEC Utrecht aan deze verschillende

aspecten van het project toekent, is zij van mening dat het verkrijgen van inzicht in de mogelijke hersenschade van pasgeborenen en de pogingen tot het ontwikkelen van therapieën om deze schade te beperken, dan wel te herstellen, het gebruik van proefdieren zoals beschreven in de aanvraag rechtvaardigt.

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.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002016751

Bijlagen

2

Datum 21 november 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 november 2016. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016751. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Post-doctoraal onderzoeker
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 december 2016
Geplande einddatum: 1 december 2021
Titel project: Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein
Titel niet-technische samenvatting: Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen
Naam DEC: Dec Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht D01.343
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: decaan
Plaats: Utrecht
Datum: 16 november 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002016751
Bijlagen
2

Datum 21 november 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 21 november 2016
Vervaldatum: 21 december 2016
Factuurnummer: 16700751
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016751	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 december 2016 16:10
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751
Bijlagen: AVD115002016751_AanhoudenBeoordelenBrief.pdf

Geachte [REDACTED]

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Maar om u aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw reactie uiterlijk **woensdag 21 december 2016**.

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002016751

Datum 14 december 2016

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1) U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie- te willen uitvoeren in drie verschillende diermodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diermodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.

Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de

dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.

Datum:
14 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD115002016751

2) In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven.

We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van het aantal pups aan te geven.

3) Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: UMC Utrecht

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD115002016751

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

14 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD115002016751

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 15 december 2016 14:47
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751
Categorieën: Dossier [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Graag wil de DEC ook reageren op uw eerste punt als volgt.

De DEC heeft uitvoerig met de aanvrager gecorrespondeerd over de kwestie die u aansnijdt in uw eerste vraag. Dit blijkt uit de vragen en antwoorden die integraal zijn opgenomen in het advies van de DEC. De aanvrager heeft toch de keuze gemaakt om de verschillende deelprojecten en sub-doelstellingen niet onder te brengen in aparte aanvragen. De DEC heeft daarmee uiteindelijk ingestemd. Voor de vraag waarom de DEC dat gedaan heeft verwijzen wij u naar deel C1 van het advies. Van alle experimenten is zonder meer aannemelijk gemaakt dat ze bijdragen aan het zelfde uiteindelijke doel dat ontegenzeggelijk van groot belang is: voorkomen of herstellen van hersenschade bij pasgeborenen. Alle deelprojecten en experimenten zijn zeer transparant beschreven en tot in detail toetsbaar. Ook is van elk onderdeel toetsbaar wat het nut van dat onderdeel is in het licht van het geheel. De DEC heeft zich gerealiseerd dat sommige delen van de aanvraag los van elkaar of parallel uitgevoerd kunnen worden, zonder dat de resultaten daarvan invloed hebben op de wijze van uitvoering van andere delen. De DEC heeft uiteindelijk geoordeeld dat, door de transparantie van het geheel, een ethische toetsing van het project waarin recht gedaan wordt aan de belangen van alle betrokken dieren, mogelijk is. De DEC twijfelde niet aan het belang, aan de kundigheid en vaardigheid van de onderzoekers en aan de kwaliteit van de opzet van dit onderzoek in proefdierkundig opzicht. Een verdere opsplitsing van de aanvraag in meerdere losse aanvragen zou er toe leiden dat de adviezen van de DEC over die losse aanvragen in elk geval voor wat betreft de ethische afweging gelijklopend zouden zijn. In dat opzicht dient het splitsen van de aanvraag geen redelijk doel. De DEC neemt namelijk aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren, gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden.

Voor wat betreft de punten 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het aan de aanvrager is om daarop te reageren.

Met vriendelijke groeten,



Secretaris DEC Utrecht | Raad van Bestuur, Kwaliteit en Patient Veiligheid, Bureau Toetsing van Onderzoek
Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer C01.106 | Huispostnummer D01.343 | Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT
T: +31 88 75 592 47 | www.umcutrecht.nl | Werkdagen: ma, di, woe, do

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: woensdag 14 december 2016 16:19

Aan: dec-utrecht

Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751

Geachte DEC Utrecht,

Op 14 november 2016 heeft u advies uitgebracht op een project aanvraag met titel 'Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein' en aanvraagnummer AVD115002016751, uw kenmerk 2016.I.557.009.

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:

1) *U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie- te willen uitvoeren in drie verschillende diersmodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diersmodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.*

Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.

2) *In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven.*

We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van het aantal pups aan te geven.

3) *Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.*

Indien u hierop ook wil reageren horen we het graag.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Bedankt voor uw reactie op onze aanvraag voor een projectvergunning voor het project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. Hieronder vind u onze reactie op uw opmerkingen en onduidelijkheden.

Opmerking 1

U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie - te willen uitvoeren in drie verschillende diermodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diermodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.

Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.

Antwoord 1

We begrijpen uw opmerking dat dit een grote aanvraag betreft. Hierover is gecorrespondeerd met de DEC, omdat zij in eerste instantie twijfelden of een ethische toetsing mogelijk was. Zoals de DEC persoonlijk naar u gecorrespondeerd heeft op donderdag 15 december jongstleden (zoals hieronder ingevoegd "Antwoord DEC Utrecht op Opmerking 1"), heeft zij na uitvoerig overleg met ons besloten dat opsplitsen van de aanvraag geen redelijk doelt dient, omdat dat ertoe zou leiden dat de ethische afweging van de DEC over die losse aanvragen gelijkloidend zou zijn. De DEC neemt daarbij aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden. Voor meer informatie verwijzen wij naar de reactie van de DEC Utrecht op donderdag 15 december 2016.

Daarnaast zijn wij van mening dat zowel wetenschappelijk als technisch de samenhang van de aanvraag dermate groot is, dat opsplitsen zou leiden tot onduidelijkheid. Omdat de samenhang u niet geheel duidelijk is, lichten we deze graag hieronder toe.

De pathofysiologie van neonatale hersenschade in algemene zin volgt grofweg twee fases: De acute fase, bestaande uit celdood en acute inflammatie, en de latere/chronische fase, bestaande uit de aanmaak van nieuwe cellen en heropbouw van het weefsel. Hieruit vloeien twee verschillende soort strategieën voor therapie: Allereerst het beschermen van het brein tegen celdood en inflammatie, oftewel "neuroprotectie" en vervolgens het stimuleren van heropbouw, oftewel "neuroregeneratie". Omdat potentiële therapieën tot dusver slechts partieel herstel geven van neonatale hersenschade, zal de toekomstige behandelstrategie in de kliniek gericht zijn op een combinatie van neuroprotectie en neuroregeneratie. Een voorbeeld hiervan is hypothermie (koelen van het brein, dit wordt reeds toegepast in de kliniek) voor het remmen van celdood in de acute fase en vervolgens het aanbieden van stamceltherapie voor het stimuleren van neuroregeneratie in de latere fase. Deze combinatietherapie zal in deze projectaanvraag worden getoetst. Omdat dit zowel een neuroprotectieve als neuroregeneratieve strategie betreft, achten wij het essentieel om de deelprojecten neuroprotectie en neuroregeneratie in één projectaanvraag te laten toetsen.

De drie beschreven diermodellen in deze projectaanvraag vertegenwoordigen drie verschillende patiëntengroepen met neonatale hersenschade. Zowel in de muis als in de mens wordt neonatale hersenschade veroorzaakt door inflammatie en/of zuurstoftekort. Het pathofysiologische mechanisme achter het ontstaan van de verschillende soorten neonatale hersenschade zijn dan ook overeenkomstig: een combinatie van celdood, excitotoxiciteit, productie van zuurstofradicalen en

inflammatie. De samenhang tussen deze verschillende diermodellen is dan ook erg groot, en het is veelbelovend om eenzelfde therapie te testen in de verschillende diermodellen. Het verschil tussen de drie soorten neonatale hersenschade is met name gebaseerd op het ontwikkelingsstadium waarin het brein zich bevindt op het moment van het insult. Dit zorgt voor uiting van schade in andere breindelen (bijv. grijze stof of witte stof) en/of in andere celtypes (bijv. neuronen of oligodendrocyten). Het uitblijven van een effect op bijvoorbeeld neuronale schade sluit niet per definitie een effect op witte stof schade uit. Om deze reden worden er geen GO/No-GO's ingebouwd tussen de verschillende diermodellen voor neonatale hersenschade en worden deze in parallel uitgevoerd.

De drie diermodellen voor neonatale hersenschade worden beschreven in bijlage 1 en 2. Er is bewust gekozen om de eerste twee diermodellen te bundelen onder één bijlage, omdat de technische handelingen overeenkomen en slechts verschillen in leeftijd van interventie, waardoor toetsing van ongerief gelijk is. Omdat het pathofysiologische mechanisme achter het ontstaan van de verschillende soorten neonatale hersenschade overeenkomstig is, kan de kennis uit de *in vitro* experimenten met de cellen uit Bijlage 3 gebruikt worden voor alle drie de diermodellen (uit bijlage 1 en 2) en deze kennis dient als primaire GO/NoGO's voor het al dan niet uitvoeren van een *in vivo* experiment (uit bijlage 1 en 2). Het uit elkaar trekken van de projectaanvraag op basis van diermodel, zorgt in onze ogen voor onduidelijkheid met betrekking tot de GO/NoGO's, die dan verschillende projectaanvragen zullen overlappen.

Antwoord DEC Utrecht op Opmerking 1 (naar CCD op 15 december 2016)

Geachte [REDACTED]

Graag wil de DEC ook reageren op uw eerste punt als volgt.

De DEC heeft uitvoerig met de aanvrager gecorrespondeerd over de kwestie die u aansnijdt in uw eerste vraag. Dit blijkt uit de vragen en antwoorden die integraal zijn opgenomen in het advies van de DEC. De aanvrager heeft toch de keuze gemaakt om de verschillende deelprojecten en subdoelstellingen niet onder te brengen in aparte aanvragen. De DEC heeft daarmee uiteindelijk ingestemd. Voor de vraag waarom de DEC dat gedaan heeft verwijzen wij u naar deel C1 van het advies. Van alle experimenten is zonder meer aannemelijk gemaakt dat ze bijdragen aan het zelfde uiteindelijke doel dat ontegenzeggelijk van groot belang is: voorkomen of herstellen van hersenschade bij pasgeborenen. Alle deelprojecten en experimenten zijn zeer transparant beschreven en tot in detail toetsbaar. Ook is van elk onderdeel toetsbaar wat het nut van dat onderdeel is in het licht van het geheel. De DEC heeft zich gerealiseerd dat sommige delen van de aanvraag los van elkaar of parallel uitgevoerd kunnen worden, zonder dat de resultaten daarvan invloed hebben op de wijze van uitvoering van andere delen. De DEC heeft uiteindelijk geoordeeld dat, door de transparantie van het geheel, een ethische toetsing van het project waarin recht gedaan wordt aan de belangen van alle betrokken dieren, mogelijk is. De DEC twijfelde niet aan het belang, aan de kundigheid en vaardigheid van de onderzoekers en aan de kwaliteit van de opzet van dit onderzoek in proefdierkundig opzicht. Een verdere opsplitsing van de aanvraag in meerdere losse aanvragen zou er toe leiden dat de adviezen van de DEC over die losse aanvragen in elk geval voor wat betreft de ethische afweging gelijkloidend zouden zijn. In dat opzicht dient het splitsen van de aanvraag geen redelijk doel. De DEC neemt namelijk aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren, gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden.

Voor wat betreft de punten 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het aan de aanvrager is om daarop te reageren.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Secretaris DEC Utrecht

Opmerking 2

In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven. We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van hetaantal pups aan te geven.

Antwoord 2

Wij danken de CCD voor deze informatie en hebben op verzoek het aantal embryo's en het aantal pups los aangegeven in Bijlage 3 en de NTS, zoals hieronder omschreven:

Bijlage 3:

"... Uit eerdere experimenten weten we dat we uit 10 breintjes voldoende cellen kunnen isoleren voor 1 in vitro experiment van 50-100 welletjes van de desbetreffende cellen. Om alle in vitro vragen te kunnen beantwoorden in deze projectaanvraag, verwachten de komende jaren per jaar 10 in vitro experimenten uit te voeren met muizen en 10 experimenten met ratten, waarvan elk 9 met pups en 1 met embryo's. Om deze experimenten uit te voeren zijn voor 5 jaar: 9 experimenten x 10 pups x 5 jaar = 450 muizenpups en 450 rattenpups nodig. Daarnaast zijn voor deze experimenten: 1 experiment x 10 embryo's x 5 jaar = 50 muizenembryo's en 50 rattenembryo's nodig."

NTS:

"Naar schatting zullen wij gedurende 5 jaar maximaal 5232 muizen gebruiken, waarvan 742 moeders, 4440 nakomelingen en 50 embryo's.

Daarnaast zullen we naar schatting gedurende 5 jaar maximaal 3166 ratten gebruiken, waarvan 331 moeders, 2785 nakomelingen en 50 embryo's."

Opmerking 3

Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.

Antwoord 3

Wij danken de CCD voor het corrigeren van de onjuiste dieraantallen in de NTS. We hebben de NTS als volgt aangepast:

NTS:

"Naar schatting zullen wij gedurende 5 jaar maximaal 5232 muizen gebruiken, waarvan 742 moeders, 4440 nakomelingen en 50 embryo's.

Daarnaast zullen we naar schatting gedurende 5 jaar maximaal 3166 ratten gebruiken, waarvan 331 moeders, 2785 nakomelingen en 50 embryo's."

We hopen u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd en kijken uit naar uw antwoord.

Met vriendelijke groeten,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002016751

Bijlagen

1

Datum 1 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 11 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de samenhang van de proeven nader onderbouwd en het aantal embryo's duidelijk in de aanvraag aangegeven. Daarnaast heeft u uw Niet-technische samenvatting aangepast.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2017 tot en met 1 december 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dec Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 november 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016751

Bezwaar

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

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

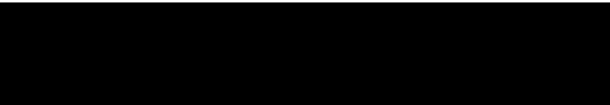
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens de:


ir. G. de Peute,
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2017 tot en met 1 december 2021, voor het project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dec Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 november 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 november 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 november 2016, ontvangen op 21 november 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 11 januari 2017

Aanvraagnummer:
AVD115002016751

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2)				3990 muizen pups en 732 zogende moedermuizen; 750 ratten pups en 104 moederratten.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	4.722	68% Matig 32% Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	854	68% Matig 32% Licht	
3.4.4.2 Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3)				1585 pups en 219 moeders
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.804	70% Matig 30% Licht	
3.4.4.3 Neuronale en gliale cellen voor primaire celweek				450 muizenpups, 10 zogende moedermuizen en 50 muizenembryo's; 450 rattenpups, 8 zogende moederratten en 50 rattenembryo's;
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	510	100% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD115002016751

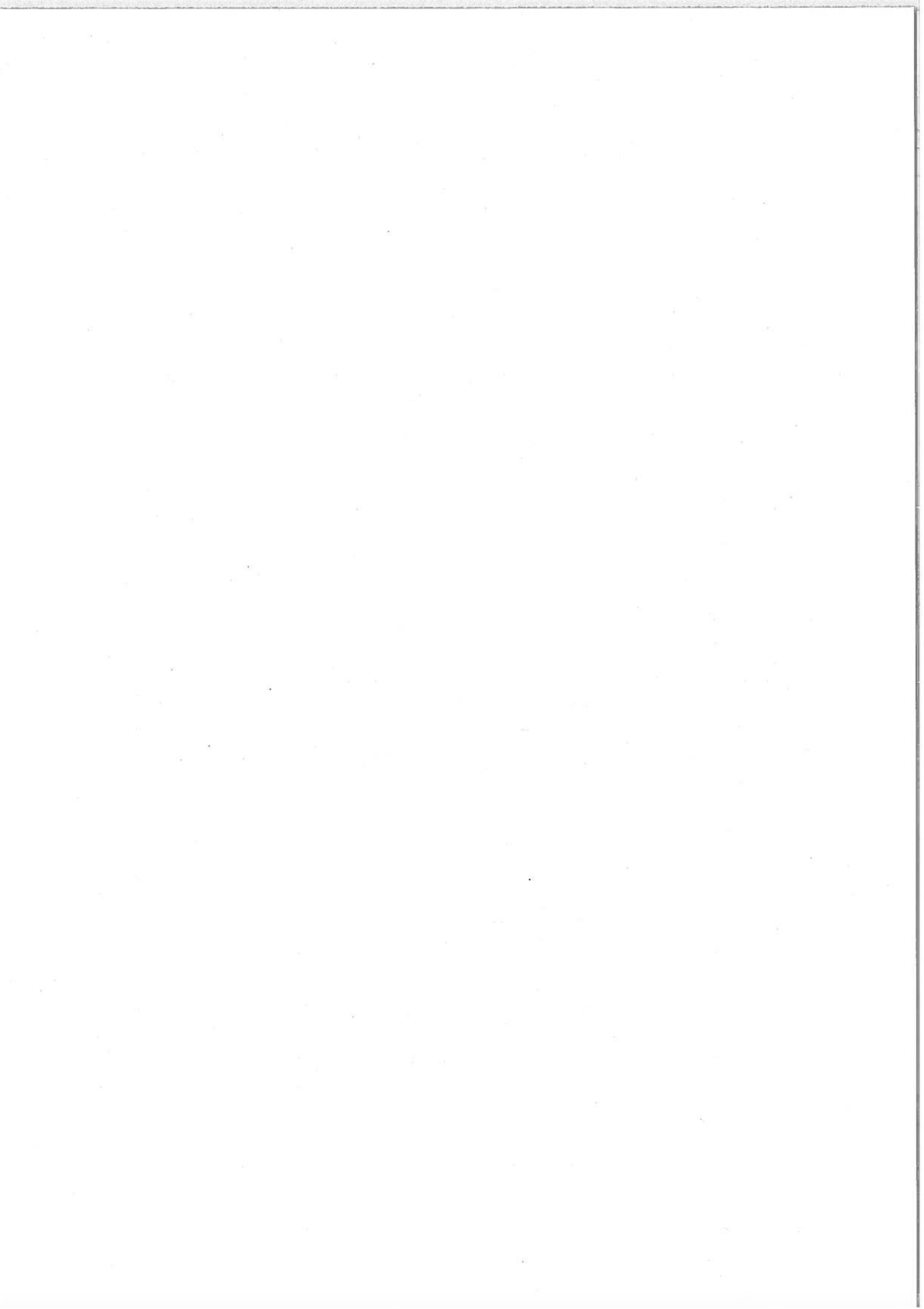
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	508	100% Licht	
--	---------------------------------------	-----	---------------	--

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.





Aanvraagnummer:

AVD115002016751

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD115002016751

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
nr.	document NTS2016765	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	

06 DEC. 2016



Centrale Commissie Dierproeven

1

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 22000 1765	<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Provimi BV	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	24131527
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Vellingweg 23
		Postbus	
		Postcode en plaats	5334LD Velddriel
		IBAN	NL39RABO0300028598
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Provimi BV
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Senior Scientist
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> 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 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 2 - 2017
- Einddatum 1 - 2 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de mogelijkheden om gezondheidsproblemen bij leghennen, veroorzaakt door de piek-productie, te verminderen door middel van voeding.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Wageningen UR
- Postadres XXXXXXXXXX
6700 HB Wageningen
- E-mailadres dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de Instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam 

Functie 

Plaats Velddriel

Datum 1 - 12 - 2016

Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The project 'Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production' aims to identify nutritional solutions to (1) increase the robustness of laying hens at

onset of lay and (2) increase nutrient availability during the (pre-)peak production period. This will increase the capability of layers to cope with this peak-production period, which is the most demanding phase in their lives. Additionally, long-term effects on health, welfare and production will be investigated.

Laying hens are reared until 19 weeks of age, after which they start to produce eggs until approximately 100 weeks of age. Peak production is reached between 25 to 33 weeks of age and in this period, hens are challenged to both maintain growth and start/reach peak production. Suboptimal nutrient strategies in this period result in a negative energy balance, i.e. hens need to deplete body fat or protein to maintain egg production [1]. Although not yet intensively studied, practical experience and long-term data suggest that the negative energy balance during peak production has long-term negative effects on health and production. New hypotheses have been created to reduce the negative energy balance with nutrition, based on recent studies with broiler breeders (own data, unpublished results).

Interaction between housing conditions and nutrition

Proper nutrition is a prerequisite for good health and welfare, as nutrition influences the physiology, growth, immune status, behaviour and production in laying hens. Additionally, housing systems and management can negatively impact the health status of hens. It is recognized that hens in Europe are housed under sub-optimal conditions, such as high stocking densities and heat challenges commonly occurs [2, 3]. This results in increased levels of stress hormones, reduced feed consumption, reduced egg production and possibly impaired immune function [4-6]. These suboptimal conditions can be reduced by altering the housing and management. Therefore, new laws on cage free systems are in place and beak trimming will be prohibited in 2018 in Europe. Although the aim of these new laws is to increase animal welfare, they have created new challenges in the management of the hens and have influenced the nutritional requirements. It is recognized that the new housing and management systems can negatively influence welfare [2]. For instance, hens in these new housing systems have increased energy requirements, more stress as shown by higher levels of stress hormone, impaired health caused by feather pecking, increased disease transmission, higher mortality rates and reduced laying percentages [2, 3, 7]. Under these conditions, the nutritional requirements vary from optimal conditions [6, 8] and can contribute to the health and welfare status of laying hens.

The current project is different from other projects of parties working on the improvement of housing conditions for laying hens, as we primarily focus on the role of nutrition. Other parties try to improve housing conditions by developing new housing systems. This may result in the development of new cage enrichment, outside areas and altered light intensities, colors and schedules. Moreover, there are parties that aim to change the laying hens themselves by means of genetic selection for e.g. feather pecking. Although we are aware that there are ongoing projects on nutrition and welfare, aiming to improve housing conditions for laying hens, the current project is again different from these projects. In contrast to other projects, we focus on all life stages and within this project aim to prevent impaired welfare by including the rearing phase rather than focusing on the production period alone. The changes in the housing conditions that are currently being developed and implemented through projects by other parties still require new feeding strategies. Therefore, the current project perfectly contributes to the ongoing development in the housing system of laying hens.

The main effect of commercial stocking density and temperature challenges is reduced feed intake and consequently reduced production [6, 9]. Reduced feed intake will limit energy intake with increased risk for a negative energy balance as a result of body weight loss. Nutritional requirements are different under optimal and suboptimal conditions [8]. With reduced feed intake and increased temperature, nutritional requirements to limit weight loss and increase health are deviating from requirements during optimal feed intake [10].

In this project, new nutritional interventions and solutions will be assessed to alleviate these challenges, currently still present with the newly developed housing systems. These nutritional interventions will be selected based upon identification of (physiological) parameters that give an indication of improved

health and welfare. These parameters will include body weight, carcass composition, organ characteristics, bone strength and composition, blood parameters, feather coverage (as an indication of feather-pecking), feed intake and production.

Rearing interventions

Laying hens must be fit to healthily maintain egg production and good egg quality during late lay. Currently, hens are considered fit when they have reached a certain body weight before the onset of egg production. However, this does not take into account the development of specific body tissues that are most important for egg production, such as the bones (for calcium mobilization), fat reserves (for energy) and the oviduct (for egg production). Development of these tissues during the pre-lay period (0-17 weeks) can be influenced by feeding strategies. Therefore, we will study body composition development in laying pullets over time, and test hypothesis on how varying nutrient provisioning could affect the body composition at onset of lay. Subsequently, the long term effects on health, egg production and egg quality will be studied.

Peak production interventions

Pre-peak and peak production are the most demanding periods for laying hens and result in a negative energy balance. Nutritional interventions can diminish negative consequences and nutrition during this period should thus be optimized. This can be achieved by increasing knowledge on potential interventions and nutrient evaluation of raw materials to be able to optimally formulate diets during this period.

Summarizing, current practical conditions in the poultry industry are not optimal. When studying nutritional requirements under optimal (experimental) conditions, important (minimum) requirements for nutrients under practical conditions will be missed. Therefore, to study optimal nutritional solutions, it is required that hens are mildly challenged. These challenges should include increased temperature (but not heat stress) and increased (commercial) stocking density.

Knowledge on nutrient evaluation and specific nutritional needs for laying hens is crucial. This project will target the end of rearing body composition and peak-production requirements, as these are the most important factors impacting laying hen health and welfare. Additionally, long-term effects will be studied. By studying nutritional interventions, this project will contribute to improved health and welfare for laying hens.

1. Grobas, S., et al., *Laying hen productivity as affected by energy, supplemental fat, and linoleic acid concentration of the diet*. Poultry Science, 1999. **78**(11): p. 1542-1551.
2. Blokhuis, H.J., et al., *The LayWel project: welfare implications of changes in production systems for laying hens*. World's Poultry Science Journal, 2007. **63**(1): p. 101-114.
3. Lay, D.C., et al., *Hen welfare in different housing systems*. Poultry Science, 2011. **90**(1): p. 278-294.
4. Craig, J.V., J.A. Craig, and J.V. Vargas, *Corticosteroids and Other Indicators of Hens' Well-Being in Four Laying-House Environments*. Poultry Science, 1986. **65**(5): p. 856-863.
5. Cunningham, D.L. and G. Gvoryahu, *Effects on Productivity and Aggressive Behavior of Laying Hens of Solid Versus Wire Cage Partitions and Bird Density*. Poultry Science, 1987. **66**(10): p. 1583-1586.
6. Hayirli, A., et al., *Nutrition practice to alleviate the adverse effects of stress on laying performance, metabolic profile and egg quality in peak producing hens: II. The probiotic supplementation*. Asian australasian journal of animal sciences, 2005. **18**(12): p. 1752.
7. Hester, P.Y., *Impact of science and management on the welfare of egg laying strains of hens*. Poultry Science, 2005. **84**(5): p. 687-696.
8. Balnave, D. and J. Brake, *Nutrition and management of heat-stressed pullets and laying hens*. World's Poultry Science Journal, 2005. **61**(03): p. 399-406.
9. Rozenboim, I., et al., *The effect of heat stress on ovarian function of laying hens*. Poultry Science, 2007. **86**(8): p. 1760-1765.
10. Lin, H., et al., *Strategies for preventing heat stress in poultry*. World's Poultry Science Journal, 2006.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

This project aims to study nutritional interventions that will (1) increase the robustness of laying hens at onset of lay and (2) increase nutrient availability during the (pre-)peak production period. This will increase the ability of layers to better cope with the peak-production period, which is the most demanding phase in their lives, and can have positive long-term effects. Therefore, also these long-term effects on health will be investigated. So, this project will contribute to improved health and welfare during the productive period of laying hens.

The research group conducting the trials within this project has the appropriate expertise to guarantee the best outcome. The responsible applicant of the current project is a scientifically trained employee, actively conducting research since 2008 and currently finishing a PhD project at Wageningen University (Adaptation Physiology Group). Next to the applicant, the project team consists of experts with PhD degrees in relevant disciplines and experience in this specific research area. Lastly, trials are executed by qualified technicians.

3.3 Relevance

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

There is an increased societal concern for animal welfare and sustainability. This has led to new European laws (Directive 1999/74/EC) on housing systems and management procedures for poultry. New laws on cage free systems are in place and beak trimming will be prohibited in 2018 in Europe. Although the aim of these new laws is to increase animal welfare, they have created new challenges in the management of the hens with new, specific nutritional requirements. It is recognized that the new housing and management systems can negatively influence welfare [1]. For instance, hens in these new housing systems have increased energy requirements, more stress as shown by higher levels of stress hormone, impaired health caused by feather pecking, increased disease transmission, higher mortality rates and reduced laying percentages [1-3]. The current project will contribute to solving these new challenges by studying nutritional requirements to further increase poultry health and welfare and support production. This project can have a big, global impact on laying hen health and welfare.

1. Blokhuis, H.J., et al., *The LayWel project: welfare implications of changes in production systems for laying hens*. *World's Poultry Science Journal*, 2007. **63**(1): p. 101-114.
2. Hester, P.Y., *Impact of science and management on the welfare of egg laying strains of hens*. *Poultry Science*, 2005. **84**(5): p. 687-696.
3. Lay, D.C., et al., *Hen welfare in different housing systems*. *Poultry Science*, 2011. **90**(1): p. 278-294.

3.4 Research strategy

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

The studies within this project will focus on nutritional solutions and interventions during rearing and the impact on body composition at start of lay. These new nutrient interventions during rearing will impact the nutritional requirements during lay, which will thereafter be assessed. Lastly, long-term effects on health, welfare and productivity will be studied. Nutritional solutions and interventions that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as amino acids or fat, to find optimal

inclusion levels. Based on previous experiments in broiler breeders (own data, unpublished results), it is expected that the amino acid recommendations for laying hens are currently suboptimal, which might contribute to a lower body weight and fewer body reserves during peak-production. Additionally, there are indications that nutritional interventions during rearing, such as providing a diluted diet, can have long-term positive effects on behaviour, for example on feather pecking. These interventions will contribute to making laying hens more fit at onset of lay. Moreover, they focus on reducing negative behaviours associated with the ban on feather pecking. Next, nutrient evaluation and inclusion levels of raw materials is necessary to optimize diets. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested. Results will be compared and used to create new nutritional solutions and recommendations for commercially housed laying hens.

Nutrient requirements vary between different housing conditions. Experimental conditions are optimal for laying hens and will result in different nutrient requirements than under commercial conditions. With this study, we aim to find optimal feeding strategies that will reduce the health-associated problems in laying hens commercially housed. Therefore, we will use commercial housing conditions as a model. This includes commercial stocking densities and a mild temperature challenge.

The project is scheduled to run for 5 years, during which three short rearing studies can be performed each year. Based on the results found in these rearing studies, long-term effects will be studied. The latter studies for long-term effects will run for more than a year.

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

The project consists of a series of studies with laying hens. To find the optimal solutions for health that are also applicable in production systems, the hens will be mildly challenged with increased temperature to a maximum of 28°C during lay (this is 3°C above the maximum temperature under experimental conditions). In addition, stocking density normal for commercial production (an increase of 1.3 hens per m²) will be used.

To assess the optimal nutritional requirements, the hens will be weighed weekly. Additionally, body composition will be studied after dissecting the hens. Lastly, blood will be collected to analyse for hormones and metabolites.

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

All factors that will be studied have an influence on the optimal nutritional solution. First the rearing studies will be conducted as it is expected that these new nutritional interventions will impact the laying period. Then, short-term laying studies will be done to study the impact of the rearing nutrition on the requirements during the laying phase. Lastly, the long-term effects will be investigated.

Each study is considered a milestone. Results of studies will be used to optimize the power required to detect differences based upon the selected treatments. For each study that is part of this project, the animal welfare body (AWB, IvD in Dutch) will be consulted to discuss the proposed study design and how this relates to previous studies.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Commercial housing conditions
2	
3	
4	

5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	22000	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Commercial housing conditions

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This project aims to study nutritional interventions that will (1) increase the robustness of laying hens at onset of lay and (2) increase nutrient availability during the (pre)peak production period in commercially housed laying hens. This will increase the ability of layers to better cope with the (pre)peak-production period, which is the most demanding phase in their lives. During this period, laying hens are exposed to sub-optimal conditions, including high stocking density and elevated temperatures. These factors negatively influence feed intake, which contributes to a negative energy balance (i.e. weight loss) and impaired health. With this low feed intake that is common under practical conditions, nutritional requirements deviate from conditions in which feed intake is higher [1, 2]. Therefore, the laying hens must be mildly challenged to study the nutritional needs under commercial housing conditions, when feed intake and body gain is low during rearing and lay. Increasing temperature will decrease appetite and thus feed intake [3, 4] and is therefore a proper model to study nutritional solutions under commercial conditions with reduced feed intake. Additionally, increased (commercial) stocking density contributes to the reduced feed intake and will also be applied [5, 6]. Lastly, the hours of light will be reduced to a minimum during the laying phase to still maintain egg production and fine mash diets will be provided to further limit feed intake.

Commercial stocking density

In some studies within this project, hens will be housed under commercial conditions. Stocking density will be increased from 7.7 birds per m² (which is the maximum number of birds allowed under experimental conditions) to 9 birds per m², which is the maximum number of birds allowed under commercial conditions in aviary systems. Stocking density of 7.7 vs. 9 birds per m² does not show a

significant difference in mortality rate or bone fractures [7]. Additionally, the incidence of aggressive and feather pecking behaviors is lower in higher stocking densities with 9 birds m² compared to 7.7 birds per m² [8]. All of these measures are important indicators of health and welfare and show that health and welfare are not expected to be affected with the increased stocking density of 1.3 birds per m². Stocking density should be increased in the studies of this project as the negative impact on the welfare of the birds will be limited while this is key to make the outcome applicable for commercial conditions.

Mild heat challenge

In some studies within this project, we will mildly challenge the hens by increasing ambient temperature, but with this model, do not aim to induce heat stress. Heat stress would severely challenge the birds, with extreme body loss, loss of performance and alter the hormone balance [1-3]. This would negatively influence our outcomes. Optimum room temperature for the lay phase is 24°C [9, 10], but room temperature will be set at a maximum of 28°C. Above 30°C, hens experience heat stress with a rapid decline in body weight, feed intake and egg production [9, 10]. Moreover, above 30°C, birds start panting, which is a sign of distress. The maximum temperature hens can handle is 40°C [10]. So, with a maximum of 28°C, we will mildly challenge the birds by increasing the temperature during the laying phase, but will avoid stress and suffering.

General experimental design

The studies within this project will focus on nutritional solutions and interventions during rearing and the impact on body composition at start of lay. Nutritional solutions and interventions that will be studied include dose response studies for nutrients. Moreover, nutrient evaluation of raw materials will be done, which are necessary to optimize diets. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested.

(Laying) hens will be dissected during the study to investigate the effect of the treatments on body composition. It is expected that the nutritional interventions will alter body composition, organ characteristics and possibly bone strength. Therefore, dissection will be done to study these effects.

Blood samples will be taken during the study for various reasons. Changes in metabolism can be measured in the blood, based on for example metabolites and enzyme levels. Additionally, nutritional interventions can change the immune function, which will also be measured in the blood, when a change is expected based on the treatment.

To assess the effect of nutritional interventions on feather pecking, feather coverage will be assessed as a measure for welfare. This is especially of interest as beak-trimming will be prohibited and it is expected that this will cause an increase in feather pecking.

Outcome parameters in which the effects of nutritional treatments will be assessed are:

- Growth performance
 - o Body weight gain
 - o Feed intake
 - o Feed efficiency
- Production parameters
 - o Egg production
 - o Egg characteristics
- Blood parameters for:
 - o Immune competency
 - o Hormone levels
- Dissection for:
 - o Body composition (incl. fat pad)
 - o Bone strengths
 - o Organ characteristics

- Immune competency
- Feather coverage

1. Balnave, D. and J. Brake, *Nutrition and management of heat-stressed pullets and laying hens*. World's Poultry Science Journal, 2005. **61**(03): p. 399-406.
2. Lin, H., et al., *Strategies for preventing heat stress in poultry*. World's Poultry Science Journal, 2006. **62**(1): p. 71-86.
3. Lara, L. and M. Rostagno, *Impact of Heat Stress on Poultry Production*. Animals, 2013. **3**(2): p. 356.
4. Samara, M.H., K.R. Robbins, and M.O. Smith, *Interaction of Feeding Time and Temperature and Their Relationship to Performance of the Broiler Breeder Hen*. Poultry Science, 1996. **75**(1): p. 34-41.
5. Hayirli, A., et al., *Nutrition practice to alleviate the adverse effects of stress on laying performance, metabolic profile and egg quality in peak producing hens: II. The probiotic supplementation*. Asian australasian journal of animal sciences, 2005. **18**(12): p. 1752.
6. Mtileni, B.J., et al., *The Influence of Stocking Density on Body Weight, Egg Weight, and Feed Intake of Adult Broiler Breeder Hens*. Poultry Science, 2007. **86**(8): p. 1615-1619.
7. Nicol, C., et al., *Effects of stocking density, flock size and management on the welfare of laying hens in single-tier aviaries*. British poultry science, 2006. **47**(2): p. 135-146.
8. Zimmerman, P.H., et al., *The effect of stocking density, flock size and modified management on laying hen behaviour and welfare in a non-cage system*. Applied Animal Behaviour Science, 2006. **101**(1): p. 111-124.
9. Al-Saffar, A.A. and S.P. Rose, *Ambient temperature and the egg laying characteristics of laying fowl*. World's Poultry Science Journal, 2002. **58**(3): p. 317-331.
10. Marsden, A. and T.R. Morris, *Quantitative review of the effects of environmental temperature on food intake, egg output and energy balance in laying pullets*. British Poultry Science, 1987. **28**(4): p. 693-704.

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

It is not necessary for all studies within this project to house the hens under commercial conditions. We will house the hens under commercial conditions for a maximum of five studies. Depending on the specific aim, (a combination of) the following animal procedures will be applied:

Increased stocking density

During the rearing period, a maximum of 11.5 laying hens per m² will be housed. During the laying period, this will be reduced to a maximum of 9 birds per usable m². This is the maximum number of birds allowed according to the European law. With these stocking densities, laying hens will have at least 4 cm per bird feeding space in case of a circular feeding trough or 10 cm per bird in case of a linear feeding trough, in line with European law for commercial housing.

Temperature and light schedule

In the entire unit, the temperature will be set at a minimum of 15°C and a maximum of 28°C. With 28°C, feed intake will be reduced but heat stress will not occur [1]. Only during the first week of life, temperature will be higher than 28°C, as this is optimal for chicks during the first week of their life. The light schedule and intensity will be set according to the EU legislation regarding laying hens. This means the hens must be able to see one another and be able to investigate their surroundings. It will follow a 24 hour rhythm with a minimum of 8 hours of darkness. To further limit feed intake, the total hours of light can be reduced to 10 hours during lay, which is the minimum hours of light possible to maintain egg production during lay.

Feeding regimes

Feed may be provided in fine mash, which will also increase feeding time. Fine mash diets are common for laying hens and will decrease feed intake compared to coarse mash diets [2]. Further limitations of

feed intake could include mild restricted feeding regimes during rearing. This can be applied to let the hens follow a growth curve, which is advised by commercial breeding companies to reduce variation.

Animal procedures include:

- Weighing of the animals (weekly)
- Dissection
- Blood collection (an average of one time per laying hen per month, with a maximum of three times per month)

Health and welfare monitoring

The health and welfare of the laying hens will be closely monitored. Measures are taken to reduce risk of distress; they focus on the strict enforcement of guidelines as described in the study protocol, with respect to monitoring the welfare of the hens throughout the study. These guidelines prescribe to monitor the health status of the hens two times a day, by means of a visual check. Furthermore, possibilities for humane endpoints have been defined. Additionally, other behaviors that indicate reduced health as a consequence of body loss will be monitored. These include hens looking pale, fluffing up their feathers and reduced mobility.

1. Al-Saffar, A.A. and S.P. Rose, *Ambient temperature and the egg laying characteristics of laying fowl*. World's Poultry Science Journal, 2002. **58**(3): p. 317-331.
2. Safaa, H.M., et al., *Effect of main cereal of the diet and particle size of the cereal on productive performance and egg quality of brown egg-laying hens in early phase of production*. Poultry Science, 2009. **88**(3): p. 608-614.

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

For the current project, we will influence feed intake between treatments by diluting the diets and varying the amino acid levels. We expect a change of approximately 4-10% feed intake, based on literature and experience. Therefore, we want to detect a difference of at least 4% between treatments. Using power calculations based on historical data, an LSD of 4% requires 6 replications per treatment with 30 hens per replicate.

Apart from the feed intake, we want to measure a difference in fat pad. We want to be able to measure relative difference in fat pad to carcass weight of at least 0.4%. Based on historical data with respect to dissection studies on layers and broiler breeders, this results in 10 laying hens per time per pen for dissection, in case of 6 pens per treatment.

We expect to study 16 treatments each year. Depending on the length of the study, this results in a maximum of 2880 laying hens each year. Depending on the study design, part of those 2880 laying hens will be dissected to study body composition. This means that a total of 14400 laying hens will be used in 5 years.

B. The animals

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

Depending on the study design, hens will be purchased between the age of 1-day-old chicks and 17 week old pullets, to study rearing conditions. All chickens will be purchased from a commercial hatchery/breeding company. For the entire project, this will result in a total of 14400 laying hens. Depending on the research question, flocks will be kept until peak production or for a maximum of 100 weeks, which is nowadays a common age for laying hens.

Only females will be used as male chickens are not capable of egg production.

No genetically modified animals will be used.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study nutritional interventions that will (1) increase the robustness of laying hens at onset of lay and (2) increase nutrient availability during the (pre)peak production period, it is necessary to use laying hens.

Replacement is not possible. The reaction of an animal to nutritional interventions is multifactorial and includes a variety of individual specific reactions including hormonal, behavioral and physiological changes. It is not possible to study these effects with alternative techniques

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired differences in production performance, especially feed intake and abdominal fat pad. These power calculations are based on historical data for similar models. To achieve the research objective, it is necessary in some studies to increase stocking density to commercial conditions. With the proposed increased stocking density, we will comply with the European law for regulations for commercial production.

Refinement is applied in various ways. For instance, a mild temperature challenge is applied and heat stress is prevented. As such, animal distress is reduced to a minimum. In addition, the number of times that animal procedures are performed that can result in stress are carefully considered for each study and reduced to a minimum. The health and welfare of the laying hens will be closely monitored.

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

Measures are taken to reduce the risk of distress. They focus on the strict enforcement of guidelines as described in the study protocol, with respect to monitoring the welfare of the animals throughout the study. These guidelines prescribe to monitor the welfare of the animals two times a day, by means of a visual check. Furthermore, possibilities for humane endpoints have been defined.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that proper nutritional interventions to minimize the negative effects associated with peak-production are lacking. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial poultry industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The housing and care of the animals used in the current experiment are in accordance with the Directive 2010/63/EU, except with regard to the stocking density, feeder space and temperature, due to scientific reasons. The Directive 2010/63/EU clearly states that: 'During agricultural research, when the aim of the project requires that the animals are kept under similar conditions to those under which commercial farm animals are kept, the keeping of the animals shall comply at least with the standards laid down in 1999/74/EC'. The latter directive will be complied with in five studies, as it is necessary for the research objective to house the birds under commercial conditions. This directive states that at least 9 laying hens per usable m² can be housed. Therefore, no more than 9 birds per m² will be housed in the current study. Additionally, temperature will be set from a maximum of 25°C under experimental conditions to a maximum of 28°C.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Commercial stocking density and increased temperature can cause lower body weights

Explain why these effects may emerge.

During the laying period, lower feed intake, which is normal under commercial conditions will be simulated. This can cause a pause or a reduction in body weight (gain).

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

A reduction in body weight is common for laying hens during peak production in commercial settings and in order to reduce this problem with nutritional solutions, we need to study it. Reduction in body weight is recognized as a risk to induce animal distress, however, animal distress is a multifactorial problem [1]. We aim to minimize the decline in animal health and welfare. Therefore, birds will be individually weight

throughout the study and especially during the peak-production period, to determine individual and group body weights and to make sure that weight loss is limited.

Measures will be taken to minimize and stop the body weight loss when growth of treatment groups is severely lacking with the control group. These measures apply when hens loose on average more than 80 grams weight (which corresponds to 5%) over the peak-production period and/or more than an average of 25 grams weight loss within one week, with the control group. Measures that can be applied to all treatments include: decreasing the temperature setting, increase the hours of light or increase food allowance. When individual body weight of hens is lower with respect to its pen mates, (according to the following formula: $(\text{average pen weight}) - (3.0 \times \text{pen SD}, \text{individual BW})$) the hen will be removed from the study. Additionally, other behaviors that indicate reduced health as a consequence of body loss will be monitored. These include hens looking pale, fluffing up their feathers and reduced mobility

1. Hen welfare in different housing systems. Poultry Science, 2011. 90(1): p. 278-294

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

When welfare is severely impaired in a hen, the animal will be euthanized.

Signs of impaired welfare that apply to all treatments include an irreversible period of inactivity (immobility). Minimally twice a day, in the morning and in the (late-) afternoon, chickens receive a visual health check and it is actively monitored if agreed symptoms of impaired welfare arise. When during two consecutive visits a chicken shows locomotion problems based on the so-called 'gait score class 3' (the bird shows a significantly reduced locomotion that affects behavior, including limping, spreaded legs and irregular movement), it will be removed from the study and euthanized.

In addition, chickens will be removed from the study when they exhibit lacking growth with respect to their pen mates according to the following formula: $(\text{average pen weight}) - (3 \times \text{pen SD})$. As birds are individually weighed throughout the study and especially during the peak-production period, determination of individual body weights will be used as an additional parameter to identify animal discomfort.

Indicate the likely incidence.

It is expected that only in rare instances the described symptoms are found.

K. Classification of severity of procedures

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

The animal procedures that will be applied in this study include: increased temperature, commercial housing, blood collection (an average of one time per laying hen per month, with a maximum of three times per month) and dissection. This results in a mild classification of the expected cumulative discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Part of the hens will be killed for tissue collection.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD220002016765**
2. Titel van het project: Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de mogelijkheden om gezondheidsproblemen bij leghennen, veroorzaakt door de piek-productie, te verminderen door middel van voeding.
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 06-12-2016
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 19-12-2016
Anderszins behandeld:
Termijnonderbreking(en) van 23-12-2016 tot 9-1-2017 en van 13-1-2017 tot 19-1-2017.
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 9-1-2017 en 19-1-2017
Advies aan CCD: 20-1-2017
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 23-12-2016, resp. 13-01-2017
Beantwoording vragen 9-01-2017, resp. 17-01-2017
Gestelde vragen en antwoorden (in twee fasen, resp. 1. en 2.):

M.b.t. tot het projectvoorstel:

1. De DEC heeft de onderzoeker met het oog op een beter begrip bij 3.1. de achtergrond (aanleiding) van het onderzoek verzocht duidelijker te formuleren, aangezien zij er van uitgaat, dat de veranderde Europese regelgeving m.b.t. verzorging en huisvesting van de leghennen hierin de concrete aanleiding vormt voor dit project (hij noemt deze nu pas bij 3.3.).

De onderzoeker heeft achtergrondinformatie aan de inleiding ter verduidelijking toegevoegd aan 3.1, vergelijkbaar met en iets uitgebreider dan de tekst onder 3.3 1.

In dit verband heeft de DEC de onderzoeker verzocht ook te verhelderen hoe het onderzoek aansluit bij en van meerwaarde is op ander onderzoek in de keten, waar veel partijen ook bezig zijn met het verbeteren van houderijcondities.

Om de gezondheid en het welzijn van leghennen te verbeteren is het nodig dat zowel de huisvesting en management geoptimaliseerd zijn, als ook dat de hennen beschikken over goede voeding. Voeding beïnvloedt namelijk de groei, gezondheid, immuunstatus en productie van leghennen. Bovendien zal de nieuwe huisvesting ervoor zorgen dat de hennen andere nutritionele behoeften hebben, doordat ze bijvoorbeeld meer bewegen of eerder zullen verenippen. Daarom is het huidige project noodzakelijk en sluit het aan bij de veranderingen in huisvesting die momenteel gaande zijn in de houderij. Bovenstaande uitleg is verwerkt in het projectvoorstel onder de inleiding.

2. *De inleiding is uitgebreid met een specifiekere toelichting over de onderscheidende aard van dit onderzoeksproject in relatie tot andere projecten en de toegevoegde waarde in aansluiting op andere projecten. Hoewel er andere projecten gaande zijn die zich vooral richten op de verbetering van huisvesting of via genetische selectie het gedrag van leghennen willen veranderen is dit project uniek aangezien het specifiek de invloed van voeding onderzoekt. Daarbij focussen we, in tegenstelling tot andere projecten die voeding*

onderzoeken, niet alleen op de legperiode maar ook op de opfokperiode om welzijnsproblemen eerder te voorkomen.

2. Daarnaast heeft de DEC de onderzoeker verzocht in te gaan op de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven.

De onderzoeksgroep die dit project gaat uitvoeren bestaat uit experts met ervaring in dit specifieke onderzoeksgebied. Bovendien heb ik, als verantwoordelijke project aanvrager, een passende wetenschappelijke opleiding genoten, ben ik sinds 2008 actief in het uitvoeren van wetenschappelijk onderzoek en momenteel een PhD in pluimvee voeding aan het afronden. Daarnaast zal het onderzoek uiteraard worden uitgevoerd door gecertificeerde dierverzorgers. Bovenstaande uitleg is toegevoegd aan de "purpose" ter verduidelijk.

M.b.t. de appendix:

1. Het is de DEC niet duidelijk, welke voerinterventies/ proefbehandelingen de onderzoeker gaat uitvoeren en hoe deze zijn gericht op het behalen van de geformuleerde onderzoeksdoelen en zij heeft hem verzocht deze duidelijker te beschrijven (met welke interventie wordt welk effect beoogd?).

Er is nadere toelichting toegevoegd onder kop A in de appendix. Dit project bestaat uit onderzoek naar drie verschillende soorten voerinterventies. In eerste instantie zal de opfokperiode worden onderzocht om ervoor te zorgen dat de leghennen robuuster zijn bij het begin van de leg. Hiervoor worden nutritionele interventies gebruikt die zijn gericht op sterkere botten en het opbouwen van vetreserves. Dit kan worden bereikt door het variëren van macronutriëntniveaus, zoals bijvoorbeeld eiwit en vet, om optimale niveaus te bepalen. Daarnaast kunnen interventies tijdens de opfok ervoor zorgen dat het verenpikken wordt verminderd, door bijvoorbeeld het voer te verdunnen met vezels. Naast interventies die vooral gericht zijn op de opfokperiode, is er onderzoek nodig naar huidige aanbevelingen op het gebied van ingrediëntinclusioneniveaus. Tot slot zullen additieven worden getest die vooral zijn gericht op verbeterde nutriëntenopname en darmgezondheid.

2. De relatie tussen de diverse voerinterventies/ proefbehandelingen met de geformuleerde onderzoeksdoelen opzet is de DEC nog steeds niet helemaal duidelijk. Zij gaat er van uit, dat er onderscheid wordt gemaakt tussen interventies in de opfokfase en interventies in de (pré)piekfase van de leg. De DEC heeft de onderzoeker verzocht dit onderscheid scherper te formuleren. In de NTS wordt er duidelijker onderscheid gemaakt tussen de beide fasen. De DEC gaat er van uit, dat hetgeen in de tweede alinea van 3.1. is verwoord, aanleiding is geweest voor dit onderzoek en dat de opfokfase daar bij is betrokken en heeft de onderzoeker verzocht dit ook te verhelderen in de appendix.

Er wordt inderdaad onderscheid gemaakt tussen de interventies in de opfokfase en de (pré-)piekfase, aangezien de interventies in de opfokfase de lichaamssamenstelling (met name de reserves) van de leghennen zal veranderen en dat van invloed zal zijn op de legfase. We zien dat er een verschil is in formulering tussen de NTS en de appendix en hebben de appendix in overeenstemming met de NTS aangepast.

2. Bovendien is het is de DEC niet duidelijk, of er in de (pré-)piekfase met verdund voer wordt gewerkt. Zij gaat er van uit dat dit niet het geval is, aangezien dit in haar ogen zou dit conflicteren met het probleem van de verlaagde voeropname en heeft de onderzoeker verzocht dit te verhelderen.

Het is inderdaad niet de bedoeling om in de (pré-)piekfase met verdund voer te werken aangezien dit de opname capaciteit zou verlagen in plaats van nutriënten opname verhogen (terwijl dit juist het doel is). Ter verduidelijking is in de appendix toegevoegd dat alleen in de opfokfase met verdund voer zal worden gewerkt. Hierdoor zal de opname capaciteit van de leghennen vergroten bij de start van de leg, waardoor de hennen tijdens de legfase meer geconcentreerd voer kunnen opnemen en minder snel in een negatieve energie balans zullen raken.

1. Bij A. geeft de onderzoeker onder 'Temperature and light schedule' aan, dat het aantal uren licht kan worden gereduceerd tot 10 u. gedurende de leg. Het is de DEC niet duidelijk, hoe dit is te rijmen met het feit, dat hij de proef onder praktijkomstandigheden wil uitvoeren, aangezien een dergelijk lichtregime daar niet mee overeenstemt en zij heeft hem verzocht dit toe te lichten.

Er zijn momenteel geen wettelijke richtlijnen voor de minimale hoeveelheid uren licht voor leghennen, anders dan dat het lichtschema een 24-uur-ritme moet aanhouden en minimaal 1/3 deel van de dag, dus 8 uur, donker moet zijn (EU directive 1999/74/EC). In de praktijk wordt er gevarieerd met het aantal uren licht en tijdens de opfok is acht tot tien uur licht de richtlijn. Naar aanleiding van deze opmerking van de DEC hebben we ervoor gekozen de tien uur licht tijdens de leg uit het voorstel te halen. Wel is er gespecificeerd dat er tijdens de opfok een kortere lichtperiode van acht uur zal worden gehanteerd (in overeenstemming met de praktijk).

1. Tevens heeft de DEC de onderzoeker verzocht nader te specificeren, welke 'guidelines' hij bedoelt met 'guidelines as described in the study protocol', waarnaar hij verwijst bij A (voorlaatste paragraaf) en D (voorlaatste zin).

Hiermee werden de guidelines bedoeld die daarna in de tekst worden genoemd, zoals: "monitor the health status of the hens two times a day, by means of a visual check. Furthermore, possibilities for humane endpoints have been defined. Additionally, other behaviors that indicate reduced health as a consequence of body loss will be monitored. These include hens looking pale, fluffing up their feathers and reduced mobility". De desbetreffende tekst is aangepast ter verduidelijking.

In aanvulling hierop heeft de onderzoeker het volgende aangegeven:

NB. Hoewel niet aangegeven door de DEC, is onder punt 2A (proposed animal procedures) bij 'weighing of the animals' het meetinterval veranderd van 'weekly' naar 'frequently'. De reden hiervoor is dat wij de dieren regelmatig individueel willen wegen om lichaamsgewicht te bepalen, maar dit ook willen afwegen tegen de stress en het ongerief dat dit zal opleveren.

M.b.t. de Niet-technische samenvatting:

De DEC heeft de onderzoeker verzocht bij 4.2. (vermindering) 'experimentele eenheden' anders te omschrijven, aangezien deze term te abstract is voor een NTS.

Dit is aangepast.

Daarnaast heeft ze de onderzoeker verzocht bij 4.3. (Verfijning) toe te voegen, dat de kippen individueel worden gewogen.

Dit is toegevoegd.

Tot slot heeft ze de onderzoeker verzocht de NTS aan te passen in overeenstemming met de wijzigingen in de appendix.

Dit is gedaan.

De antwoorden hebben geleid tot adequate aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De uit te voeren experimenten zijn in één type dierproef ondergebracht. Het project is gericht op het onderzoeken van mogelijkheden om de lichaamsconditie van leghennen rondom piek-productieproductie te verbeteren d.m.v. voedingsinterventies. Er zal zowel naar de korte als naar de lange termijn worden gekeken.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is: het bestuderen van het effect van nutritionele interventies leghennen in de opfok van leghennen op henparameters in het begin en in de piekperiode van de leg onder commerciële huisvestingsomstandigheden.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is: het zodanig optimaal tegemoet komen aan de nutritionele behoeften van leghennen, dat er robuuste leghennen ontstaan met goede legresultaten en gezondheid en verbeterd welzijn. De verkregen kennis wordt gebruikt om aanbevelingen voor de sector te formuleren m.b.t. voerprogramma's, die beter aansluiten bij de nutritionele behoefte van het dier.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn: de kippenboeren (economisch belang); de onderzoekers (economisch belang/ carrièremogelijkheden); de proefdieren (ongerief door verhoogde bezettingsdichtheid en staltemperatuur, stress); de doeldieren (verbeterd welzijn); de veevoederindustrie (economisch belang); de maatschappij (verminderen negatieve effecten intensieve dierhouderij); de consumenten (goedkoop houden van het voedselpakket).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten voor zover de DEC kan overzien, aangezien het niet vooraf bekend is, welke voeders er worden getest.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn (zie A.9).
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Er wordt een verhoogde bezettingsgraad gehanteerd (conform Europese wetgeving voor praktijkhuisvesting van leghennen) en de staltemperatuur zal iets worden verhoogd. Het toepassen van praktijkomstandigheden is nodig om de huidige praktijkproblemen te kunnen simuleren en voerstrategieën te testen, die de hennen hierin kunnen ondersteunen.
11. De DEC stelt vast dat het cumulatieve ongerief als "licht" realistisch is geschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit een verminderde voeropname met een enkele weken durende, geleidelijke gewichtsafname als gevolg, die door het dier als ongerief kan worden ervaren.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Dit project onderzoekt de nutritionele behoefte van leghennen. Deze behoeften worden bepaald door meerdere factoren zoals hormonen, gedrag en fysiologie. Die kunnen niet worden nagebootst met alternatieve technieken.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het minimale aantal benodigde dieren is statistisch bepaald en zal worden verminderd op basis van voorgaande experimenten wanneer dit statistisch mogelijk blijkt.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC zien geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Leghennen zijn de doeldieren.
18. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project, i.v.m. weefselverzameling. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

19. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het doel, nl. het bestuderen van het effect van nutritionele interventies in de opfok van leghennen op henparameters in het begin en in de piekperiode van de leg onder commerciële huisvestingsomstandigheden, op tegen het lichte ongerief voor de proefdieren?
2. Bij de beoordeling van het doel heeft de DEC enerzijds meegewogen dat de huidige vraag niet nieuw is, maar wel opnieuw actueel is geworden als gevolg van nieuwe wettelijke regels met betrekking tot de huisvesting en verzorging van leghennen. Op basis hiervan is er sprake van een reëel belang voor de pluimveehouders. Het gaat hierbij zowel om een economische waarde als kennis die bijdraagt aan een verantwoorde wijze van dierhouderij. Voor de onderzoekers schat de DEC het belang in als gering. De waarde van kennisvermeerdering speelt een rol, maar het project richt zich primair op toepassing in de pluimveehouderij. Als het project zijn uiteindelijke doel bereikt zal dit ook voor de dieren in de houderij een belang hebben. De waarden van welzijn en gezondheid spelen in dat geval. De invloed op deze waarden is nu nog niet goed in te schatten, maar de DEC acht deze matig. Ook de veevoederindustrie heeft bij de resultaten van het project een belang. Het gaat hierbij primair om een economische waarde. Ook de maatschappij en de consumenten zullen in dat geval een gering voordeel hebben, met name in verband met het verminderen van de negatieve effecten van de intensieve dierhouderij, aangezien een verbeterd dierenwelzijn ook in hun belang is. Tot slot zijn er waarden voor de proefdieren in het geding. Er is sprake van geringe welzijnsaantasting door verhoogde bezettingsdichtheid en staltemperatuur en een verminderde voeropname met beperkte gewichtsafname als gevolg. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
3. De DEC heeft in haar afweging betrokken dat er sprake is van een project dat een samenhangend geheel betreft. Gezien de opzet is de DEC van mening dat het directe en uiteindelijke doel haalbaar zijn en dat dit onderzoek kan bijdragen aan de belangen en waarden zoals hierboven genoemd. De DEC is van mening dat het doel en de daarmee verbonden waarden het geringe ongerief voor de proefdieren rechtvaardigen en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
De piek-productieperiode bij leghennen is fysiologisch zeer belastend. Dit heeft negatieve gevolgen voor gezondheid, welzijn en productie. Het doel van dit project is om via voeding de leghennen aan het begin van de legperiode in een betere lichaamsconditie te krijgen en de nutriënten beschikbaarheid tijdens de piek-productie te verhogen.
De DEC is zich terdege bewust dat de concrete vraag opkomt in de context van de huidige intensieve veehouderij en dat . De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. In de aanpak van dit project ziet de DEC mogelijkheden dat hier een bijdrage aangeleverd wordt. Deze beoordeling staat echter in de context dat (a) er sprake is van veranderde Europese regelgeving m.b.t. verzorging en huisvesting van de leghennen die leiden tot nieuwe vragen op het terrein van een goede voerstrategie en (b) de economische randvoorwaarden waarbinnen de veehouderij opereert. Op beide aspecten heeft de DEC slechts zeer beperkte invloed. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie aangezien die al

plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage kan leveren aan het verbeteren van het welzijn van de dieren. In de ogen van de DEC zijn de dierproeven niet gericht op een praktijk waarbij het welzijn van de dieren zodanig beïnvloed wordt dat dit intrinsiek tot schade aan de dieren leidt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV

██████████
Veilingweg 23
5334 LD VELDDRIEL



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD220002016765

Bijlagen

2

Datum 6 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 december 2016. Het gaat om uw project "Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD220002016765. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

6 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD220002016765

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
6 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD220002016765

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 22000
Naam instelling of organisatie: Provimi BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 24131527
Straat en huisnummer: Veilingweg 23
Postcode en plaats: 5334 LD VELDDRIEL
IBAN: NL39RABO0300028598
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Provimi BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

6 december 2016

Aanvraagnummer:

NL020002016765

Over uw project

Geplande startdatum:

1 februari 2017

Geplande einddatum:

1 februari 2022

Titel project:

Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production.

Titel niet-technische samenvatting:

Onderzoek naar de mogelijkheden om gezondheidsproblemen bij leghennen, veroorzaakt door de piek-productie, te verminderen door middel van voeding

Naam DEC:

DEC Wageningen UR

Postadres DEC:

Postbus 9101, 6700 HB Wageningen

E-mailadres DEC:

dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 935,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED] r

Plaats:

Velddriel

Datum:

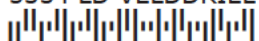
1 december 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV

██████████
Veilingweg 23
5334 LD VELDDRIEL



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220002016765
Bijlagen
2

Datum 6 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 6 december 2016
Vervaldatum: 5 januari 2017
Factuurnummer: 16700765

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD220002016765	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV

Veilingweg 23
5334 LD VELDDRIEL



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220002016765
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production." met aanvraagnummer AVD220002016765. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production." starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 20 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD220002016765

Bezwaar

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

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

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



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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris 

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Provimi BV
Adres: Veilingweg 23
Postcode en plaats: 5334 LD VELDDRIEL
Deelnemersnummer: 22000

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Testing nutritional interventions in laying hens to reduce health problems associated with peak-production." met aanvraagnummer AVD220002016765, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 januari 2017, ontvangen op 20 januari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Commercial housing conditions				
	Kippen / leghennen	14.400	Licht	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke (voer)interventies en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde

Aanvraagnummer:
AVD220002016765

voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD220002016765

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD220002016765

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.