

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017826	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage animal procedure				x	x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Mail verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Verzoek om aanvulling en antwoorden				x		x	x		
9	Advies CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		



24 JAN. 2017

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	10800
		<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	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
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	Instantie voor Dierenwelzijn Utrech
		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.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	PhD candidate
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 2 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bestudering van het effect van voeding en medicatie op autistisch gedrag
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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
- 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



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.

Autism spectrum disorder (ASD) is an heterogeneous cluster of severe neurodevelopmental disorders. It is characterized by impairments in social interaction and communication and the presence of stereotyped

behaviours (1). Although the aetiology of ASD is unknown, it is thought that ASD is a multifactorial disorder with a strong genetic component (2,3). A variety of environmental factors are suggested to contribute to ASD development. For example, prenatal exposure to teratogens has been shown to be a significant risk factor for ASD (4). Indeed, maternal use of the anticonvulsant valproic acid (VPA) is associated with the development of ASD in the offspring (5,6,7). The mechanism for VPA-induced symptoms of ASD is still unclear, but several pathways have been proposed. These include attenuation of folic acid metabolism, inhibition of histone deacetylases and increased oxidative stress (8). In search of underlying mechanisms, animal models of VPA-induced autism-like behaviours have been established in rats and mice. In a well-characterized murine model, VPA in utero-exposed mice exhibit developmental and behavioural deficits comparable to those observed in ASD patients, including deficits in social behaviour, stereotyped behaviour, anxiety and impairments in cognition (9,10). Furthermore, observations were more prominent in male offspring compared to female offspring (9,10), which reflects the human situation where a marked male preponderance is observed in ASD patients (11). Disturbances in the immune system are repeatedly reported in various organs of ASD patients. Since ASD is primarily a disorder of the central nervous system, the brain is a major target for immunological research. In post-mortem brains of patients with ASD, marked activation of astroglia and microglia is observed when compared to controls (12,13), indicative of neuroinflammation. Enhanced activation of neuroglia was also observed in various murine models of autism (14,15,16). In addition, enhanced levels of a wide range of cytokines and chemokines were found in the brain (17) and in the cerebrospinal fluid (18) of autistic children, compared to healthy children. This supports the presence of neuroinflammatory conditions in the brain of ASD patients. Peripheral immune abnormalities in autistic individuals have also been reported, including differential monocyte responses to *in vitro* stimulation (19,20), dysfunctional natural killer (NK) cells (21) and altered serum levels of immunoglobulins (22), cytokines (23) and chemokines (24). Immune disturbances have also been observed in the gastrointestinal tract of ASD patients. The presence of gastrointestinal problems in these patients is repeatedly reported in literature and include chronic constipation, diarrhoea and abdominal pain (10). These symptoms have been attributed to changes in gut microflora (25,26), increased intestinal permeability (27) and intestinal inflammation (28).

[REDACTED]

All results will also allow us to better understand the involvement of the gut-immune-brain axis in the development of the disease.

Experiments and results of this project are important for two European project proposals that are or will be submitted in the near future,

[REDACTED]

1. American-Psychiatric-Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Press, Washington DC (2000).
2. A. Bailey, A. Le Couteur, I. Gottesman, P. Bolton, E. Simonoff, E. Yuzda, M. Rutter. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.*, 25 (1995), pp. 63–77.
3. S.E. Folstein, B. Rosen-Sheidley. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.*, 2 (2001), pp. 943–955
4. D. Dufour-Rainfray, P. Vourc'h, S. Tourlet, D. Guilloteau, S. Chalon, C.R. Andres. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35 (2011), pp. 1254–1265
5. J. Christensen, T.K. Gronborg, M.J. Sorensen, D. Schendel, E.T. Parner, L.H. Pedersen, M. Vestergaard. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Jama*, 309 (2013), pp. 1696–1703
6. S.J. Moore, P. Turnpenny, A. Quinn, S. Glover, D.J. Lloyd, T. Montgomery, J.C. Dean. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J. Med. Genet.*, 37 (2000), pp. 489–497
7. A.D. Rasalam, H. Hailey, J.H. Williams, S.J. Moore, P.D. Turnpenny, D.J. Lloyd, J.C. Dean. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.*, 47 (2005), pp. 551–555
8. A. Ornoy. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?. *Reprod. Toxicol.*, 28 (2009), pp. 1–10
9. S. Kataoka, K. Takuma, Y. Hara, Y. Maeda, Y. Ago, T. Matsuda. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16 (2013), pp. 91–103
10. [REDACTED]
11. E. Fombonne. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J. Clin. Psychiatr.*, 66 (Suppl 10) (2005), pp. 3–8
12. J.T. Morgan, G. Chana, C.A. Pardo, C. Achim, K. Semendeferi, J. Buckwalter, E. Courchesne, I.P. Everall. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatr.*, 68 (2010), pp. 368–376
13. S.H. Fatemi, T.D. Folsom, T.J. Reutiman, S. Lee. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse*, 62 (2008), pp. 501–507
14. U. Ratnayake, T.A. Quinn, M. Castillo-Melendez, H. Dickinson, D.W. Walker. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I: C at mid-pregnancy. *Brain Behav. Immun.*, 26 (2012), pp. 1288–129
15. N.C. Derecki, J.C. Cronk, Z. Lu, E. Xu, S.B. Abbott, P.G. Guyenet, J. Kipnis. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*, 484 (2012), pp. 105–109
16. C.J. Yuskaitis, E. Beurel, R.S. Jope. Evidence of reactive astrocytes but not peripheral immune system activation in a mouse model of Fragile X syndrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802 (2010), pp. 1006–1012
17. X. Li, A. Chauhan, A.M. Sheikh, S. Patil, V. Chauhan, X.-M. Li, L. Ji, T. Brown, M. Malik. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.*, 207 (2009), pp. 111–116
18. D.L. Vargas, C. Nascimbene, C. Krishnan, A.W. Zimmerman, C.A. Pardo. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.*, 57 (2005), pp. 67–81
19. H. Jyonouchi, L. Geng, A. Ruby, C. Reddy, B. Zimmerman-Bier. Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J. Pediatr.*, 146 (2005), pp. 605–610
20. C.A. Molloy, A.L. Morrow, J. Meinzen-Derr, K. Schleifer, K. Dienger, P. Manning-Courtney, M.

- Altaye, M. Wills-Karp. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J. Neuroimmunol.*, 172 (2006), pp. 198–205
21. A.M. Enstrom, L. Lit, C.E. Onore, J.P. Gregg, R.L. Hansen, I.N. Pessah, I. Hertz-Picciotto, J.A. Van de Water, F.R. Sharp, P. Ashwood. Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain Behav. Immun.*, 23 (2009), pp. 124–133
22. L. Heuer, P. Ashwood, J. Schauer, P. Goines, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, L.A. Croen, I.N. Pessah, J. Van de Water. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res.*, 1 (2008), pp. 275–283
23. A.M. Manzardo, R. Henkhaus, S. Dhillon, M.G. Butler. Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 30 (2012), pp. 121–127
24. P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, I. Pessah, J. Van de Water. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav. Immun.*, 25 (2011), pp. 40–45
25. P. Louis. Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig. Dis. Sci.*, 57 (2012), pp. 1987–1989
- [REDACTED]
27. L. de Magistris, V. Familiari, A. Pascotto, A. Sapone, A. Frolli, P. Iardino, M. Carteni, M. De Rosa, R. Francavilla, G. Riegler, R. Militerni, C. Bravaccio. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 51 (2010), pp. 418–424
28. P. Ashwood, A. Anthony, A.A. Pellicer, F. Torrente, J.A. Walker-Smith, A.J. Wakefield. Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J. Clin. Immunol.*, 23 (2003), pp. 504–517
29. D.L. Coury, P. Ashwood, A. Fasano, G. Fuchs, M. Geraghty, A. Kaul, G. Mawe, P. Patterson, N.E. Jones. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics*, 130 (Suppl 2) (2012), pp. S160–S168
30. .B. Adams, L.J. Johansen, L.D. Powell, D. Quig, R.A. Rubin. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.*, 11 (2011), p. 22
31. S.E. Levy, S.L. Hyman. Use of complementary and alternative treatments for children with autistic spectrum disorders is increasing. *Pediatr. Ann.*, 32 (2003), pp. 685–691

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?

Based on the results of previous studies the following sub-objectives and research questions are defined:

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]

3.

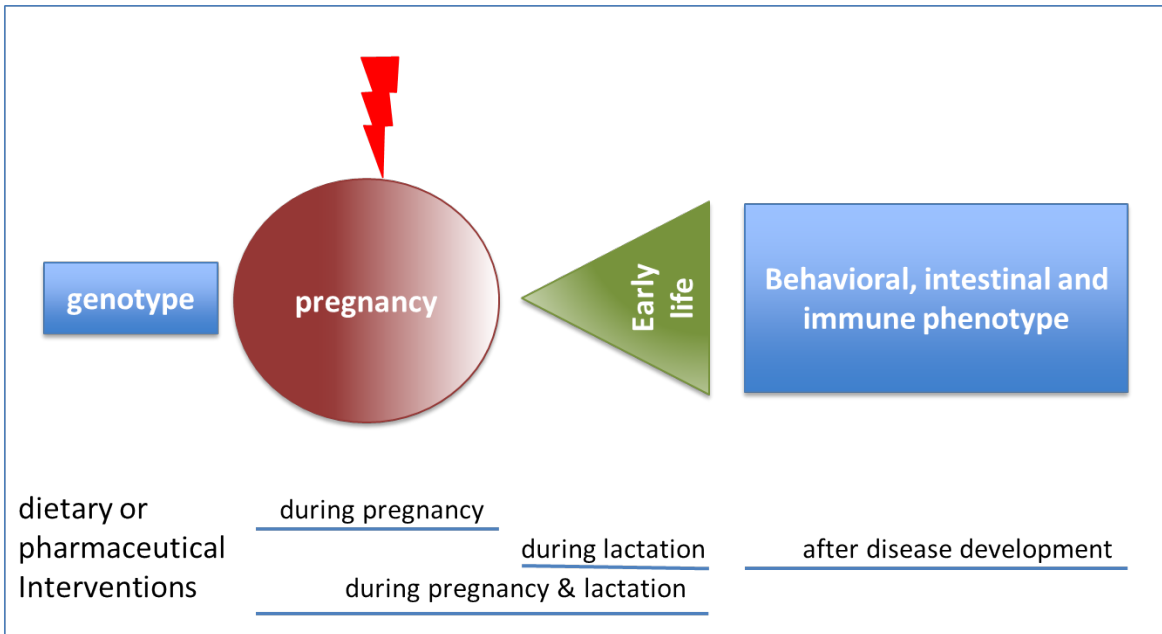


Figure 1. Harmful environmental factors during pregnancy such as valproic acid (VPA) can have permanent effects on the functioning of the brains and behavior later in life and the possibilities of therapeutic interventions in early life and later in life.

The objectives are achievable since:

1. We have an excellent expertise in the field of the gut-immune-brain axis (see references below).
2. The VPA model, described in this application is established and validated.
3. We are well trained on the procedures involved in the study.

[Redacted text block]

- █ [REDACTED]
- █ [REDACTED]
- █ [REDACTED]

3.3 Relevance

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

According to the literature, the prevalence of ASD has increased 20 times, from a rate around 1: 2500 in the mid-1980s to a rate of 9:1000 at present in the USA (1,2). Although many believe the ASD escalation represents better and earlier diagnosis, improved public awareness and expanding criteria to fulfil the diagnosis, these changes do not appear to adequately account for the rapid rise (3).

ASD patients experience impairments in social interaction and communication and the presence of stereotyped behaviours (4). Immune disturbances have also been observed in the gastrointestinal tract of ASD patients. The presence of gastrointestinal problems in these patients is repeatedly reported in literature and include chronic constipation, diarrhea and abdominal pain (5). All these symptoms have severe impact for the quality of life of the patients themselves and their parents.

There is still little knowledge regarding the environmental factors involved in the gut-immune-brain axis in ASD and there is still no cure for the disease.

The present study might contribute to the knowledge on the underlying mechanisms of ASD [REDACTED]. There is an urgent demand for new strategies regarding ASD prevention and treatment. [REDACTED]

1. Wingate M et al., Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2012 Mar 30; 61(3):1-19.
2. Genuis SJ. Is autism reversible? *Acta Paediatr.* 2009 Oct; 98(10):1575-8.
3. Hertz-Picciotto I, Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology* 2009; 20: 84–91
4. American-Psychiatric-Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5.* American Psychiatric Press, Washington DC 2013.

3.4 Research strategy

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

[REDACTED]

[REDACTED]

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.

A mouse model for autism (VPA model) will be used to evaluate the competence [REDACTED]. The model has been validated in several studies, including studies performed by our group. Females will be mated until a vaginal plug is detected (day 0). Around gestational day 11, pregnant females are subcutaneously injected with VPA or PBS. The interventions will start before pregnancy or after weaning. Behavioural tests will be conducted throughout the model to evaluate the behavioural modulation of the different dietary components or antibiotics.

Through investigating the following parameters, detailed information about the effects and mechanism of action of the different components can be achieved in the VPA model: changes in behaviour, [REDACTED]

[REDACTED]

These parameters can be investigated in blood and in organs like intestinal tissue, mesenteric lymph nodes, spleen and/or other organs and body fluids.

Previous studies demonstrated that postnatal exposure to [REDACTED], [REDACTED], can affect behavioural parameters related to social, exploratory, and repetitive behaviour in mice (1).

When investigating the behavioural influence of [REDACTED]

[REDACTED] it is essential to not only investigate the effects in diseased state, but also examine the effects in healthy state. By examining the aforementioned parameters in healthy mice receiving an [REDACTED] will give us more insight in the mechanism of action and the similarities and differences in healthy and diseased situations.

1. Dinan TG & Cryan JF. Microbes, immunity and behavior: psychoneuroimmunology meets the microbiome. *Neuropsychopharmacol.*, Jul 2016

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

The described segments in the strategy are crucial to evaluate the competence of the dietary components and antibiotics [REDACTED]

[REDACTED] By acquiring more knowledge about how these behavioural changes occurs and the effect of the different components on these changes may in the future lead to better a prevention/treatment of

ASD.

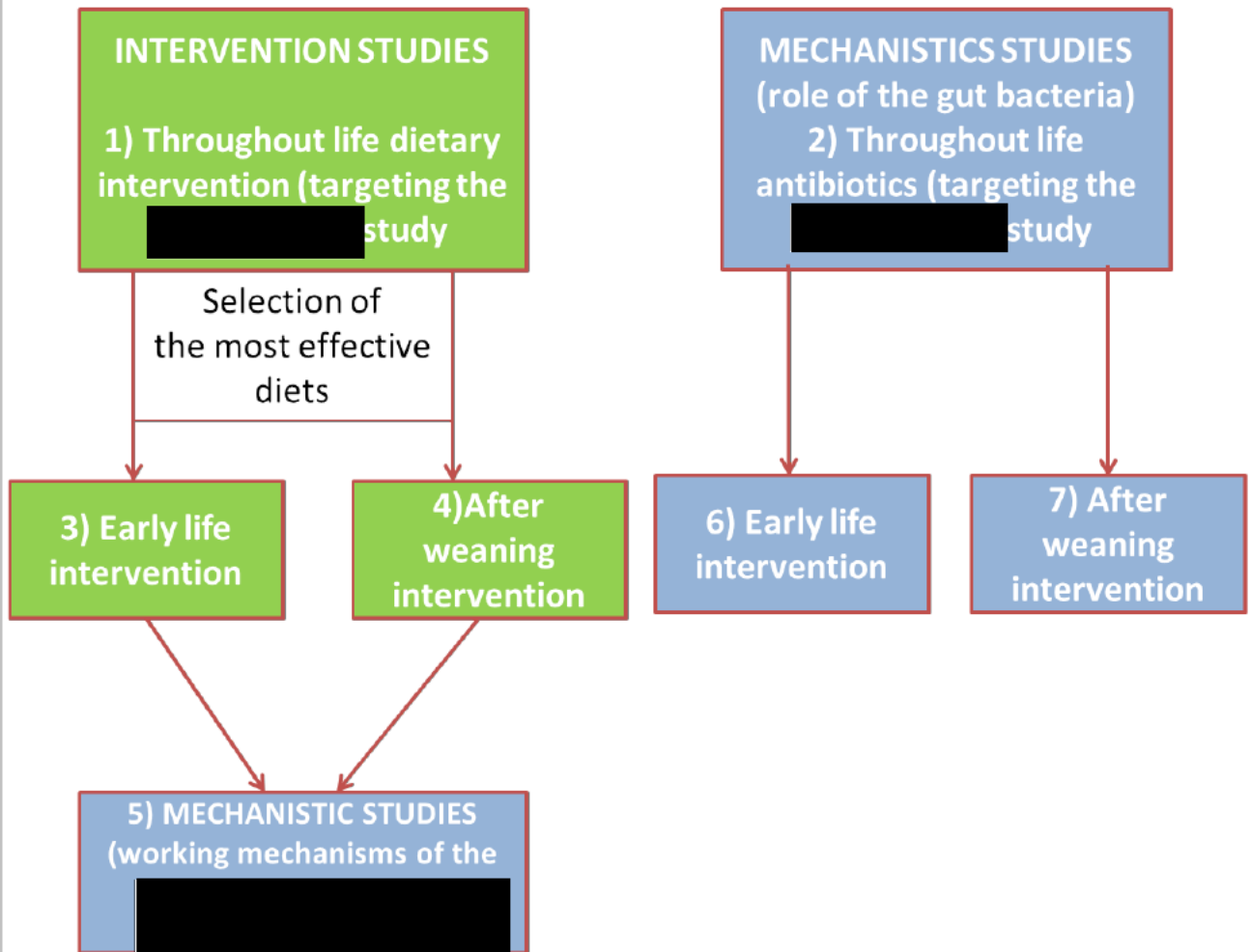


Figure 2: Flow chart of experiments. (Green boxes correspond to the intervention studies, Blue boxes correspond to the mechanistic studies).

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	Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics |
- 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.

In utero exposure to VPA in mice results in developmental and behavioural deficits in the male offspring comparable to those observed in ASD patients, including deficits in social behaviour, stereotyped behaviour, anxiety and cognition. Moreover, a VPA-induced intestinal phenotype was demonstrated in mice (inflammation and changes in microbiota composition), these symptoms have been also described in ASD patients.

Different behavioural test will be performed during different stages of development to test the effects of different dietary and antibiotics.

Primary outcome parameters will be:

- Social behaviour: Ultrasonic vocalisation (UV), social interaction test (SI)
- Exploratory/ anxiety-like behaviour: Marble burying (MB)
- Spatial memory test (SM).

These behavioural tests will be assessed at selected periods after birth (day of birth, P=0), around, P10 (UV; childhood) P30, P45 and P60 (SI, MB, SM; pre-pubescence, pubescence and adulthood,

respectively). Together, the combination of these behavioural tests reliably indicates whether social and exploratory behaviours as well as spatial memory are affected by the diets or the antibiotics.

As we aim to investigate the mechanisms in which our treatments can affect behavioural development, we will use examinations of the brain, the intestinal tract and immune system as secondary outcome measures:

[REDACTED]

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

All female mice will be mated until a vaginal plug is detected, and will be indicated as gestational day 0 (G0). On G11, pregnant females will be treated subcutaneously with either 500mg/Kg VPA or phosphate buffered saline. The [REDACTED] will start before conception or after weaning.

Dietary interventions and antibiotics given throughout life (including pregnancy):

Around 2 weeks before conception females will be [REDACTED] the females will be treated before conception with either [REDACTED] or vehicle through the drinking water. [REDACTED] will continuously be given to lactating dams and offspring throughout the experiment. Female mice will be assigned randomly to control and experimental groups.

Dietary interventions and antibiotics given during early life (during pregnancy and lactation):

2 weeks before conception females will be [REDACTED] the females will be treated before conception with either [REDACTED] or vehicle. [REDACTED] will be continuously be given to lactating dams and offspring till day of weaning (P21). Female mice will be assigned randomly to control and experimental groups.

[REDACTED] given after weaning:

On day 21 after delivery (P21), pups will be weaned and will be [REDACTED] the pups will be treated with either [REDACTED] or vehicle. Nests will be assigned randomly to control and experimental groups.

Behavior will be tested as described below:

Ultrasonic vocalisation will be assessed around day P10 to investigate early life social behaviour. Exploratory and social behaviours and spatial memory test will be assessed at three different time points around: P30, P45, P60 (representing pre-pubescence, pubescence and adulthood, respectively). Together, the combination of these behavioural tests reliably indicates whether social, exploratory behaviours and memory, of healthy mice or hampered by the VPA treatment, are affected/corrected by the [REDACTED].

Isolation-induced ultrasonic vocalizations in pups: The ultrasonic vocalization, or isolation calling,

of infant mice has been studied as a measure of early communicative behavior between a pup and its mother (1). For the induction of isolation-induced ultrasonic vocalizations, around 10 days old pups are separated from mother and littermates under room temperature for 10 minutes. Pups are individually randomly removed from the nest and gently placed into an isolation box made of plastic containing clean bedding material. Emission of ultrasonic vocalizations is monitored by a microphone placed in the roof of the sound attenuating box. The microphone is connected via an amplifier to a personal computer, where acoustic data are recorded with a sampling rate of 250,000 Hz in 16 bit format. The microphone that is used for recording is sensitive to frequencies of 15-180 kHz with a flat frequency response (± 6 dB) between 25-140 kHz (2).

Marble burying test: This test assesses anxiolytic and exploratory behaviour of mice, we expect that VPA-in utero exposed mice will show increased anxiety and decreased exploratory behavior. We expect to modulate this behavior with diets and/or antibiotics. The cage will be filled with approximately 2-3 cm deep wood chip bedding, lightly tamped down to make a flat, even surface. A regular pattern of 20 glass marbles will be placed on the surface, evenly spaced, each about 4 cm apart. One mouse is placed in the cage and left for 30 minutes. The mouse will be undisturbed and potential sources of ultrasound will be eliminated. The number of marbles buried with bedding (to 2/3 of their depth) will be counted (3)(4).

Social interaction: We expect that VPA-in utero exposed mice will show a decrease in social interaction as seen in previous experiments using the same model. We expect to improve social interaction with diets and/or antibiotics. The behavioural assessment used is adapted from a previous description (5). Mice are placed in a 45 × 45 cm open field, with 2 small perforated Plexiglas cages (10 cm diameter) located against opposite walls allowing visual, olfactory and minimal tactile interaction. Mice are habituated to the open field for 5 min and an age- and gender-matched healthy unfamiliar target mouse is introduced in one of the cages for an additional 5 min. By using video tracking software (EthoVision 11, Noldus), an interaction zone around the 2 cages is digitally determined to measure time spent in the interaction zones, latency until first occurrence in the interaction zones and total distance moved.

Spatial memory test

We expect that VPA-in utero exposed mice will show a decrease in cognitive impairment (decreased spatial memory). We expect to improve cognition with diets and/or antibiotics.

Mice ability to react to a spatial novelty after a 3 min delay is measured. Mice are individually submitted to seven consecutive, 6-min sessions. During session 1 (S1), mice are placed into the empty open field. During sessions 2–4 (S2–S4), five objects will be present, and mice will be placed into the apparatus to allow them to habituate to the apparatus and to the objects configuration (habituation phase). During the 3-min intersession interval, the animals were returned to a waiting cage located inside the test room. During the spatial test session (S5), the objects configuration was changed by moving two objects (displaced objects, DO) and leaving the other three objects in the same position (non-displaced objects, NDO). After the spatial test session in both experiments, animals were submitted to two additional sessions: 6 and 7, with an intersession interval of 3 min. In session 6, the configuration of the objects was kept unchanged as compared to S5. In the last session (session 7), one of the familiar objects was replaced by a new object (substituted object, SO); the other four objects were left unchanged (non-substituted objects, NSO). In all sessions, locomotor activity was recorded by counting the number of sector crossings. From sessions 2 to 7, object exploration was evaluated on the basis of the mean time spent by the animal in contact with the different objects. A contact was defined as the snout of the subject actually touching an object. Habituation to objects exploration was assessed by averaging the duration of contacts with the five objects during sessions 2, 3, and 4 in each group. The animals' ability to selectively react to the spatial change was analyzed by calculating the spatial re-exploration index ($DO [S5] - DO [S4] = DO$ and $NDO [S5] - NDO [S4] = NDO$) (6).

In a limited number of studies, the following readouts can be added to the protocol: intestinal permeability, muscle function tests (grip strength) at the end of the experiment.

Intestinal permeability

Intestinal permeability will be detected after administration (by oral gavage) of a test inert substances (for example fluorescent FITC-labeled dextrans). Between 1 and 6 hours after intake 1 blood sample will be drawn by cheek puncture for detection of probe levels in the serum. Measurements of the intestinal permeability are very important. An increase in intestinal permeability might lead to an increase in bacterial translocation, an increase in the immune response and oxidative stress that might ultimately lead to changes on behaviour and immune function.

Additional mechanistic studies to gain knowledge on the mode of action of the [REDACTED]

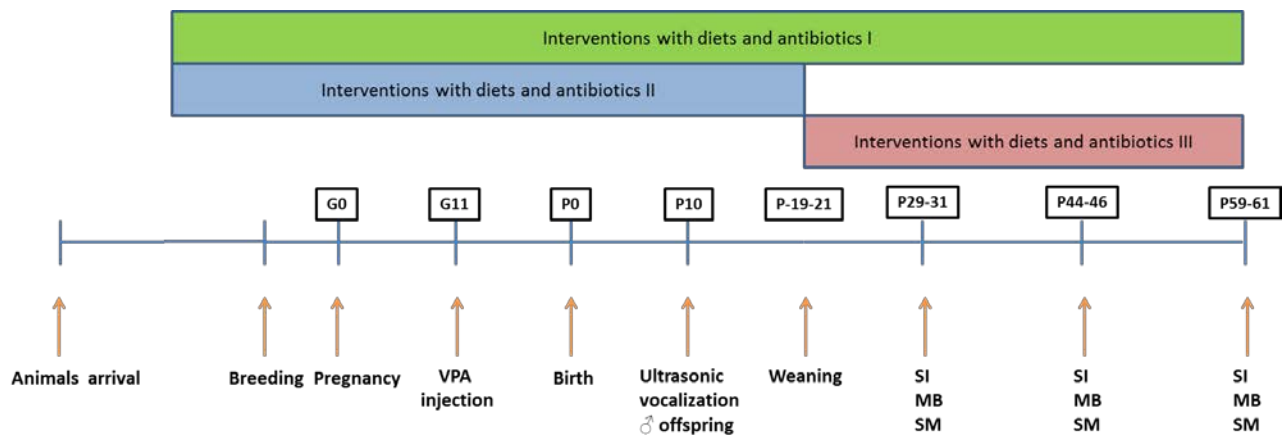


Figure 1. Experimental design. Valproic acid:VPA; gestation: G; days after birth: P; social interaction test: SI; marble burying test: MB; spatial memory test: SM

1. Hofer MA et al. (2002) Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 8:Unit 8.14.
2. Spink AJ et al. (2012) *Proceedings of Measuring Behavior. 8 th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research*
3. Njunge K & Handley SL (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 38(1):63-7
4. Deacon, RMJ (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols.* 1(1):122-4.
5. Liu J et al. (2012) Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci.* 15(12):1621-3.
6. De leonibus E. et al. (2007) Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl).* 194(4):517-25

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

- The number of animals needed in each group will be calculated by using a power calculation method, based on the primary parameters, including data from previous studies. Experience has taught us that our group size for VPA studies generally is between 8 – 12 animals per group
- During the project, the calculations will be fine-tuned based on most recent data available from the already conducted experiments from the project in order to ensure we use the minimal necessary number of animals and that we apply a well-monitored reduction strategy.
- Whenever multiple questions (test interventions) will be tested in one study, the power-calculation will be discussed with a statistics expert (in consultation with the animal welfare body).
- Serial experiments will be performed in phases, to enable the use of data from the first

experiment to further optimize the following experiment(s) (power calculation, go-no go, etc.).

B. The animals

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

For these studies, BALB/c mice from a registered breeding laboratory in the EU will be used.

For breeding purposes the same amount of males and females will be ordered. We know from previous experiments that only 50% of the females get pregnant and that every nest contains on average 2 male pup (We will try to increase the breeding success by acquiring measures previously discussed with the IvD and the technicians from the gdl). **At the day of weaning male offspring will be housed in randomly assigned groups of 6 male mice per cage and each cage will be assigned for a certain treatment.** For our studies we want to use only the male offspring that will be randomly assigned to the different experimental groups. The deficits in social behavior, stereotyped behavior, anxiety and impairments in cognition as well as the intestinal phenotype (decrease in intestinal epithelial integrity, increase infiltration of immune cells) after VPA injection has been shown to only affect the male offspring (1,2), which reflects the human situation where a marked male preponderance is observed in ASD patients (3).

By using *in vitro* studies, previous preclinical experiments and literature/patent search 6 different [REDACTED] are selected for testing in the VPA model, separately and in different combinations. In addition, 2 [REDACTED]

The interventions with the nutritional components are given before pregnancy and for the duration of the experiments (mother and pups), before pregnancy until weaning (mother) or after weaning (pups).

The intervention should be tested both a healthy and VPA affected mice since previous studies in our lab have indicated that the tested [REDACTED] might also effect the behaviour of the healthy mice.

1. A typical [REDACTED] experiment could consist of the following groups

Control pups (not exposed to VPA)

- Control [REDACTED]
- Intervention 1
- Intervention 2
- Intervention 3
- Mix intervention 1, 2 and 3

Pups exposed during pregnancy to VPA

- Control [REDACTED]
- Intervention 1
- Intervention 2
- Intervention 3
- Mix intervention 1,2 and 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 120 pups per experiment. The expected number of breeders 120 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 240 mice.

- We expect to test different [REDACTED] in 4 of the above/or comparable experiments with interventions throughout life.
- After testing all components, depending on outcome of the first experiments, selected 4 diets will

be tested at a 2 different [REDACTED] starting points (e.g. early life or starting after weaning): 2 of the above/or comparable experiments.

We expect to use a maximum of $240 \times 4 + 240 \times 2 = 1440$ animals

2. A typical experiment with pharmacological interventions to gain insight in the mechanism of [REDACTED] (by using, for example, SCFA receptors and TLRs receptors) could consist of the following groups

Pups (either controls or exposed to VPA in utero)

- Control [REDACTED] and vehicle treatment
- Control [REDACTED] and drug treatment
- Active [REDACTED] intervention and vehicle treatment
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 1
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 2
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 144 pups per experiment. The expected number of breeders 144 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 288 mice.

- We expect to test the 1 [REDACTED] intervention protocol depending on outcome of previous experiments (the most promising [REDACTED] intervention).
- We expect to test 3 antibiotics experiments

We expect to use a maximum of $288 \times 3 = 864$ animals

3. A typical experiment with [REDACTED] could consist of the following groups

Control pups (not exposed during pregnancy to VPA)

- Vehicle treatment
- Antibiotic dose 1
- Antibiotic dose 2
- Antibiotic dose 3

Pups exposed during pregnancy to VPA

- Vehicle treatment
- Antibiotic dose 1
- Antibiotic dose 2
- Antibiotic dose 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 96 pups per experiment. The expected number of breeders: 96 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 192 mice.

- We expect to test the 2 antibiotic intervention in 3 doses in 2 of the above/or comparable experiments with interventions throughout life.
- The most effect antibiotic will be tested a 3 doses at a 2 different starting points (e.g. early life or starting after weaning).

We expect to use a maximum of $192 \times 2 + 192 \times 2 = 768$ animals

The total number of mice maximally used for the whole project will be $1440 + 864 + 768 = 3072$ animals

Surplus mice: female pups (they do not develop autistic like behaviour) ,non-pregnant females and half of the mothers (saline-injected) will be available for re-use.

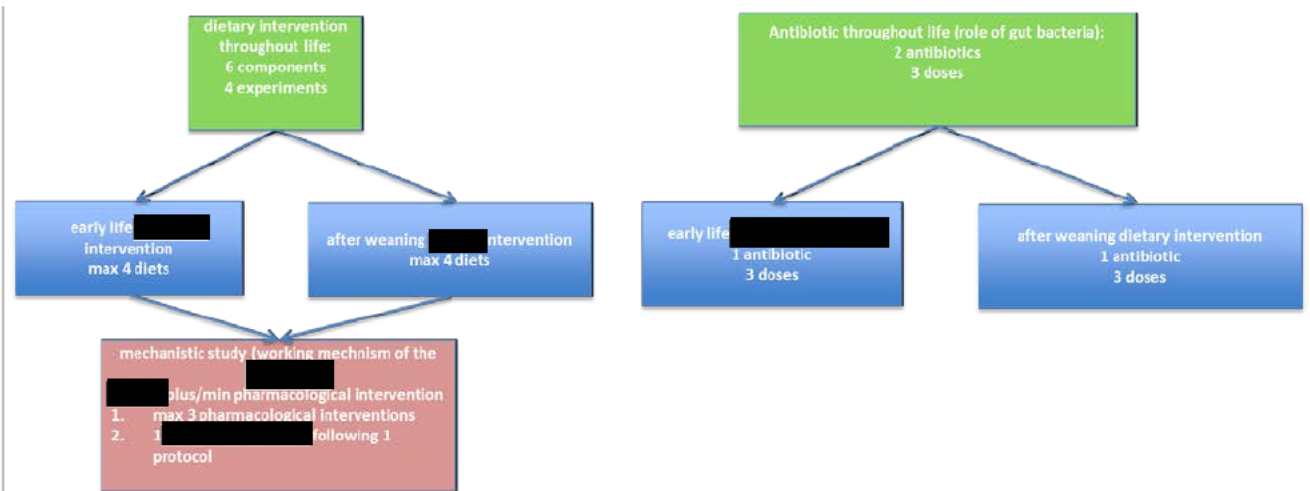


Figure 2. Flow chart of experiments.

1. S. Kataoka et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16 (2013), pp. 91–103
2. [redacted]
3. E. Fombonne. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J. Clin. Psychiatr.*, 66 (Suppl 10) (2005), pp. 3–8
4. Sandler et al 2000 Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol.* (2000) Jul;15(7):429-35.
5. Kumar H et al. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res.* (2016) Jan 1;1630:83-97.

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.

The experimental strategy described taking into account principles of replacement, reduction and refinement. Because of the complexity of gut to brain signalling, it is not possible to investigate the effects of [redacted] on brain development and behaviour only in an *in vitro* set-up.

The effects of the [redacted] has already been investigated in the past for bacteria and in cell systems. On the basis of these results, the composition of the [redacted] interventions will be determined. There are no side effects expected from the [redacted]. However, all the animals will be checked daily. Group size will be calculated using a defined relevant effect size and a prior obtained within-group variance, taking Bonferroni correction into account for multiple comparisons. This power calculation will

be based on behavioural parameters that have been measured repeatedly in our department under similar conditions as in these studies. Whenever possible, we will combine studies that use the same control groups. In this way we can reduce the number of animals used, but we will make sure that the likelihood of success will not be compromise. To optimize wellbeing of the animals, animals will be housed in groups in an enriched environment.

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

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily. When clinical signs indicate severe discomfort animals will be euthanized.

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.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

Stress may result from handling and exposure to the behavioural tasks

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

We set-up the animal model before, using the minimum dose of VPA. Treatment and behavioural experiments are conducted by an experienced researcher.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily. When clinical signs indicate severe discomfort animals will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

< 2 %

K. Classification of severity of procedures

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

Mothers:

VPA injection: mild

Saline injection: mild

Dietary intervention: none

Intervention with antibiotics (oral): mild

Off spring:

Behavioural tests: mild

Dietary intervention: none

Intervention with antibiotics (oral): mild

In a limited number of studies, the following readouts in the off spring can be added to the protocol: intestinal integrity: mild

The cumulative discomfort level of the procedures in one experiment will not exceed mild discomfort level.

Based on the accumulation of the discomfort induced by described procedures and the duration of the experiments we estimate the discomfort to category mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We need to collect the organs and tissues (brain, intestinal tract etc) and analyse them to get substantial data on the role of the gut-immune-brain axis in ASD. For these experiments, animals will be sacrificed by decapitation to obtain the intact brain without prior sedation by appropriately trained handlers, because the use of sedatives has been reported to alter gene expression and intracellular signaling pathways in the brain (Hughes and Dragunow, 1995 Pharmacol. Rev. 47: 133).

VPA treated mothers (cannot be used as surplus mice) will be sacrificed by an overdose of anaesthesia.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017826

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017826. 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:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017826

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017826

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD candidate
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 februari 2017
Geplande einddatum: 1 februari 2022
Titel project: The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.
Titel niet-technische samenvatting: Bestudering van het effect van voeding en medicatie op autistisch gedrag
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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: Utrecht
Datum: 11 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
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
AVD108002017826
Bijlagen
2

Datum 17 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 17 januari 2017
Vervaldatum: 16 februari 2017
Factuurnummer: 170826
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017826	€

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 10:50
Aan: [REDACTED]
CC: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD108002017826

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen aan u. Het betreft uw project; The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice, met aanvraagnummer AVD1080002017826.

De titel op de NTS komt niet overeen met de titel van de NTS in het aanvraagformulier. De titel van het project spitst zich toe op de muis, terwijl u beoogd om translationeel onderzoek te doen en de beschrijving van de achtergrond onder 3.1 van het projectvoorstel zich ook toespitst op de humane situatie. Kunt u de titel heroverwegen en meer algemeen stellen.

Kunt u controleren of de juiste versie (aangepast op basis van DEC advies) van de bijlage dierproeven is ingediend? Op basis van het advies van de DEC zou bij de Humane Eindpunten het gewicht als parameter verwijderd zijn, en zou er meer specifiek beschreven zijn dat nestgenoten niet bij elkaar in een experimentele groep gehuisvest worden.

Gebaseerd op het feit dat mannelijke nestgenoten niet in dezelfde experimentele groep worden ingedeeld en dus niet bij elkaar gehuisvest worden: hoe voorkomt u dat dieren solitair worden gehuisvest? Is uw fokschema zodanig dat er binnen een bepaald tijdsbestek dieren worden geboren en gezamenlijk worden gespeend? Verklaart dit ook voor een deel het relatief lage foksucces?

U beschrijft dat u dat veranderde microbiota een uitleesparameter is voor uw project, de uitleesparameters hiervoor worden niet duidelijk uit de beschrijving van de experimentele handelingen. Meet u de microbiota samenstelling alleen bij terminatie van het experiment of doet u ook tussentijds een meting door bijvoorbeeld feces te verzamelen?

De behandeltijd van uw project is opgeschort totdat wij de antwoorden hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd de aanvullingen aan ons toe te sturen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen aan u. Het betreft uw project; The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice, met aanvraagnummer AVD1080002017826.

1. De titel op de NTS komt niet overeen met de titel van de NTS in het aanvraagformulier. we have changed it accordingly. De titel van het project spitst zich toe op de muis, terwijl u beoogd om translationeel onderzoek te doen en de beschrijving van de achtergrond onder 3.1 van het projectvoorstel zich ook toespitst op de humane situatie. Kunt u de titel heroverwegen en meer algemeen stellen.

We have changed the title now in: The gut-immune-brain axis in ASD: transnational studies of the effects of dietary components and antibiotics

2. Kunt u controleren of de juiste versie (aangepast op basis van DEC advies) van de bijlage dierproeven is ingediend? Op basis van het advies van de DEC zou bij de Humane Eindpunten het gewicht als parameter verwijderd zijn, en zou er meer specifiek beschreven zijn dat nestgenoten niet bij elkaar in een experimentele groep gehuisvest worden.

The weight as a parameter has been removed and a better description is included now about group housing.

3. Gebaseerd op het feit dat mannelijke nestgenoten niet in dezelfde experimentele groep worden ingedeeld en dus niet bij elkaar gehuisvest worden: hoe voorkomt u dat dieren solitair worden gehuisvest? Is uw fokschema zodanig dat er binnen een bepaald tijdsbestek dieren worden geboren en gezamenlijk worden gespeend? Verklaart dit ook voor een deel het relatief lage foksucces?

Directly after weaning the male offspring will be house randomly in groups of 6 mice per cage and each cage will be assigned for a certain treatment. This information has been included.

We do not make a strict scheme with a short period for all the animals to be born or weaned. We understand it is very difficult. We also do not believe our breeding success is low. We discussed it with animal caretakers from our animal facilities as

well as breeding companies and it turned out that our breeding success for this strain is OK.

4. U beschrijft dat u dat veranderde microbiota een uitleesparameter is voor uw project, de uitleesparameters hiervoor worden niet duidelijk uit de beschrijving van de experimentele handelingen. Meet u de microbiota samenstelling alleen bij terminatie van het experiment of doet u ook tussentijds een meting door bijvoorbeeld feces te verzamelen?

Fecal samples will be collected at different timepoints during the experiment to measure SCFA (microbiome activity). At the end of the experiment, cecum content will be analyzed to measure the microbiome composition. This information has been added.

De behandel tijd van uw project is opgeschort totdat wij de antwoorden hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd de aanvullingen aan ons toe te sturen,

Met vriendelijke groet, 



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017826
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." met aanvraagnummer AVD108002017826. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u een aantal vragen voorgelegd. Op basis van deze antwoorden heeft u de documenten van uw aanvraag herzien.

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 "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Dit advies is opgesteld op 5 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:
AVD108002017826

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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." met aanvraagnummer AVD108002017826, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. 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 16 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 5 januari 2017, ontvangen op 16 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics				
	Muizen (Mus musculus) / balb/c	3.072	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

Aanvraagnummer:

AVD108002017826

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.

Voorschriften

In afstemming met de IvD worden maatregelen onderzocht om het foksucces waar mogelijk te optimaliseren zodat het hoger dan 50% is.



Aanvraagnummer:

AVD108002017826

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:

AVD108002017826

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.858.023
2. Titel van het project : The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary and pharmacological components
3. Titel van de NTS : Het effect van beïnvloeding van de darmflora op het afweersysteem, de hersenen en gedrag bij autisme

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: 10-10-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 24-10-2016 en 16-11-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 31-10-2016/07-11-2016 en 22-11-2016/12-12-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 05-01-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 16-11-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: vo onderzoeker + PI
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

Het doel wordt door de onderzoekers nog steeds omschreven van als een interventiestudie in plaats van als een mechanistische studie. Maar de interventie is een middel voor mechanistisch onderzoek. Onderzoekers beamen dat het fundamenteel onderzoek is waarbij met interventies mechanistische studies worden gedaan. Het doel zal worden aangepast.

De DEC vraagt zich af of er ook samenwerking/contact is met de kliniek. Hierover staat niets in het projectvoorstel. Onderzoekers geven aan dat er een klinische trial gaande is in mensen en dat dit is genoemd in het projectvoorstel. Daarnaast noemen zij dat er wel samenwerkingen/connecties zijn, maar niet specifiek voor dit project. Wel kunnen ze het grotere geheel van samenwerking/consortium weergeven. De DEC raadt de onderzoekers aan dit op te nemen in het projectvoorstel. Het is belangrijk om connecties te noemen, zeker wanneer er parallellen zijn met humaan onderzoek. Het onderzoek kan dan beter in het geheel geplaatst worden.

De onderzoekers blijven bij een fokresultaat van ca. 50%. De DEC is van mening dat een hoger fokresultaat mogelijk moet zijn en raadt de onderzoeker aan contact op te nemen met de IvD om samen met hen te onderzoeken wat de reden is van dit matige percentage, hoe hoog dit percentage landelijk is en welke maatregelen eventueel genomen kunnen worden om dit percentage omhoog te brengen. Daarnaast raadt de DEC de onderzoekers aan om de link naar een artikel van Jackson van 20 jaar geleden te verwijderen, omdat dit geen goede afspiegeling is van de huidige situatie hier.

Met betrekking tot de keuze voor het gebruik van mannelijke dieren vraagt de DEC zich af of het klopt dat valproïnezuur geen effect heeft op het gedrag van vrouwtjes of dat het meer prominent aanwezig is in mannetjes? Onderzoekers geven aan dat het humaan meer prominent aanwezig is bij mannen dan bij vrouwen en het bij vrouwelijke muizen zelfs helemaal niet wordt gezien in het fenotype. De DEC raadt de onderzoekers aan om dit duidelijk weer te geven in het projectvoorstel en '*much more prominent*' te wijzigen of aan te geven dat het over mensen gaat. Tevens raadt de DEC de onderzoekers aan om toe te lichten waarom het toch een goed model is als het alleen in mannen werkt.

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

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 31-10-2016
- Datum antwoord: 07-11-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U meldt dat er een groot klinisch onderzoek gestart is. De DEC vraagt zich af of u van plan bent om deze gegevens te gebruiken in deze proefopzet en kan daar een go/no go aan vast geknoopt worden zodat u duidelijk in de aanvraag kunt laten zien wat de relatie is tussen wat u bij de mens vindt en hier wilt doen (backwards translation). *In the described approved clinical trial, researchers are going to use only one specific probiotic mixture in pre-schoolers with ASD. We are not involved in any way with this clinical trail. In our pre-clinical trial we aim to investigate the effects of different combinations of components targeting the microbiome () and we start the interventions at different time points (throughout life, during pregnancy and lactation and after weaning). Therefore, though results from the presented clinical trail will be of great value for our study, we can not back translate their finding to our preclinical trial*

since the interventions are very different. Maybe the sentence was a bit confusing. It has been removed.

- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de achtergrond anders op te bouwen. Graag eerst aangeven wat al bekend is over autisme, wat u vervolgens aanvult met de resultaten uit eigen onderzoek, gevolgd door literatuur (niet alleen verwijzen, maar ook kort benoemen). Vervolgens geeft u aan wat nog mist en wat u met dit onderzoek verder wilt onderzoeken.

The last part of the background has been changed according to your comments.

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert om niet te spreken over farmacologische beïnvloeding maar over beïnvloeding van de microbiota d.m.v. antibiotica.

It has been changed.

- 3.2 Doel: In de visie van de DEC dient het doel anders geformuleerd te worden, namelijk niet primair als interventie onderzoek, maar als fundamenteel onderzoek met mogelijke translatie mogelijkheden naar de mens. Immers de meerwaarde van het onderzoek is het mechanistische deel terwijl de interventie studie ook direct bij de mens kan worden uitgevoerd. Graag wijzigen.

It has been added.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Er worden wel mechanistische studies gedaan bij de effectieve [REDACTED] maar niet bij de interventies met de antibiotica. Als u mooie effecten ziet bij de [REDACTED] waarom kijkt u dan niet ook mechanistisch bij de antibiotica?

As we explained now in the last paragraph, the use of antibiotics is part of the mechanistic studies to investigate the importance of the intestinal bacteria in the valproic acid-induced intestinal phenotype and autism-like behaviour in mice. In addition, to antibiotics, we also want to possibly study other pharmacological interventions to examine the effects of [REDACTED]

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC raadt u aan de takken van onderzoek in figuur 2 anders te benoemen. U kunt wellicht beter spreken over antibiotica (rechter tak) en [REDACTED] [REDACTED] Zoals het nu is afgebeeld wordt de lezer op het verkeerde been gezet omdat deze verwacht dat het gaat om beïnvloeding op hersenniveau door de farmacologische interventies. Het doel is echter de aanpassing van het microbioom door antibiotica dan wel [REDACTED] en het microbioom beïnvloed uiteindelijk al in de baarmoeder de ontwikkeling van de hersenen.

Figure 2 has been changed.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Vlak boven figuur 2 staat de zin: *The pharmacological treatment will contain mainly antibiotics that will also affect the microbiota.* 'Mainly antibiotics' suggereert dat iets anders ook mogelijk is. Graag toelichten of verwijderen.

The sentence has been deleted.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het werkt verhelderend indien u nog aangeeft wat u bij de testen verwacht te zien. Wat is precies de uitleesparameter?
What we expect from the primary outcome parameters has been added where the behavioural test are described.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Figuur 1 in de bijlage (tijdsbalk) is zwart en dus niet goed te lezen.
Figure 1 has been changed.
- B. De dieren: U geeft aan dat het fokresultaat 50% is. Dit is aan de lage kant want bij de Balb/c ligt het gemiddelde normaliter rond de 80-90%. Ook de nestgrootte van 4-5 pups is aan de lage kant. De gemiddelde nestgrootte is 6-7 pups. De DEC raadt u aan om bij de fokker na te vragen wat historische data zijn, want de DEC neemt geen genoegen met deze fokresultaten. Indien het eigen fok betreft dan dient de fokmethodiek geoptimaliseerd te worden.
We indicated that breeding success is 50% according to the experience from our group with Balb/c mice in our animal facilities, it has been reported to be even below 50% (<http://www.informatics.jax.org/silver/tables/table4-1.shtml>). We also experienced that the average litter size is 4-5 pups, and it has been previously reported to be 5.2. (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BALB.shtml>)
- B. De dieren: Er worden man/vrouw metingen gedaan, maar dat zou een haremparing kunnen zijn, wat veel mannetje bespaart. Eén mannetje kan bij 2 tot 5 vrouwen gezet worden. Als de vrouwtjes langer bij elkaar zitten gaan ze synchroniseren en is met behulp van een uitstrijkje te zien wanneer ze ovuleren. Indien dit een eigen fok is dan klopt de fokmethodiek niet en dient dan verfijnd worden. Graag uw reactie.
Indeed 1 male can mate with several females. According to the people from our group with expertise regarding breeding in Balb/c mice. 2 females per male works best. We will then need only half of mating males. However the amount of male breeders is not included in the DEC application. According to the IVD we do not need to include male breeders.
- B. De dieren: De DEC vraagt zich af of de fokvrouwen opnieuw gebruikt worden?
Half of the mothers (saline-injected) will presented to the animal lab as surplus animals.
- B. De dieren: U geeft aan dat de 'onset' 80% is in mannen. Bent u van plan, indien u een effectieve behandeling vindt bij mannelijke dieren, om het experiment te herhalen in de vrouwelijke muis? Daarnaast is de genetische aanleg, die bij de mens aanwezig is bij de expressie van autisme, in het muismodel niet aanwezig. Waarom zouden vrouwen niet ook autistisch zijn in het muizenmodel? Wellicht heeft u deze gegevens al, zo ja dan opnemen in de aanvraag. Graag uw visie.
According to previous experiments from our group, the male VPA-exposed offspring shows reductions in social interaction and intestinal alterations. Female VPA in utero-exposed mice, on the contrary, did not display behavioural or intestinal alterations when compared to control females. Therefore, we do not intent to repeat the experiments in female mice. The enigma of the male bias in ASD remains unsolved. Not only in humans, but also in

preclinical rodent studies, effects of prenatal immune activation and maternal stress on neurodevelopment and behaviour are strongly sex dependent. Programming of the sexually dimorphic brain is determined by exposure to testosterone and oestrogen that affect cell differentiation, migration, survival and connectivity. VPA inhibits the conversion of testosterone to oestradiol, which could explain the sex-specific neurodevelopmental effects of VPA. Furthermore, it is suggested that oestrogen and progesterone provide protection against the neurotoxic effects of VPA by enhancing anti-oxidant mechanisms, making females less vulnerable.

- B. De dieren: De twee mannelijke pups uit één nest (volgens uw eigen berekening) mogen niet in dezelfde groep komen. De DEC verzoekt u dit toe te voegen aan de opmerking dat de groepen random worden ingedeeld.

It has been changed in B.

- B. De dieren: Figuur 2: Welke farmacologische interventies worden gedaan bij de mechanistische studies? Of betreft het alleen antibiotica?

As described above, we want to use different antibiotic intervention to mechanistically study the importance of intestinal bacteria and the consequence of timing of antibiotic-induced intestinal bacteria depletion/changes. In addition, to antibiotics, we also want to possibly study other pharmacological interventions to examine the effects of [REDACTED]

- J. Humane eindpunten: U geeft aan dat de muizen pas bij ernstig ongerief gewogen worden. De DEC acht dit veel te laat. Daarnaast is de DEC er geen voorstander van om het lichaamsgewicht als parameter te nemen, want het bepalen van gewichtsafname bij drachtige muizen is lastig. De DEC geeft de voorkeur aan klinische observaties en raadt u aan het wegen als parameter te verwijderen.

It has been changed.

- L. Wijze van doden: De DEC vraagt zich af wat gebeurt er met de dekmannen, de fokvrouwen, de vrouwelijke pups, etc. Graag voor alle groepen dieren toelichten wat na afloop van het experiment met hen gebeurt.

Breeding mothers injected with saline and breeding males will be presented to the animal lab for use as surplus mice. VPA-treated mothers will be sacrificed by an overdose of anaesthesia.

- L. Wijze van doden: Decapitatie is geen methode volgens de EU Directive en moet derhalve gemotiveerd worden.

According to the annex IV of Directive 2010/63/EU decapitation might be used if other methods are not possible. For these experiments, animals will be sacrificed by decapitation to obtain the intact brain without prior sedation by appropriately trained handlers, because the use of sedatives has been reported to alter gene expression and intracellular signaling pathways in the brain (Hughes and Dragunow, 1995 Pharmacol. Rev. 47: 133).

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Hier graag refereren naar wat voor onderzoek er al in mensen loopt en dat de voorliggende aanvraag een mechanistisch en voor wat betreft de interventies, een proof of principle studie is. Tevens dient ook hier het doel anders en scherper geformuleerd te worden.

A reference of an overview of clinical studies is added: Uit een overzicht van lopende klinische studies op het gebied van autisme blijkt dat er vooral farmacologische stoffen getest worden (<https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/condition/612/autism>).

The word "medicatie" is replaced by "antibiotica".

The purpose of the study is described in more detail:

1. *Door middel van dit onderzoek willen we testen of veranderingen in de darmflora door voedingsmiddelen of antibiotica van invloed zijn op autistisch gedrag en darmproblemen.*
 2. *Onderzoek in het darmweefsel, het immuunsysteem en de hersenen zal meer inzicht geven in de rol van de darmflora.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 22-11-2016
- Datum antwoord: 12-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: In uw antwoord heeft u aangegeven 'medicatie' te hebben vervangen door 'antibiotica', maar de DEC vindt dit geen goede vervanging en verzoekt u hier nogmaals naar te kijken.
We have check the NTS and changed accordingly.

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: in het doel is het project nog steeds als een interventiestudie omschreven, terwijl het fundamenteel onderzoek is waarbij met interventies mechanistische studies worden gedaan. De DEC adviseert u het doel te wijzigen zodat dit duidelijk wordt.

The purpose has been adapted.

- 3.1 Achtergrond: De DEC ziet graag dat u het grotere geheel van samenwerking/consortium weergeeft in het projectvoorstel, zodat het voorliggende project beter in het geheel geplaatst kan worden.

Experiments and results of this project are important for two European project proposals that are or will be submitted in the near future, [REDACTED]

2.

[REDACTED]

Bijlage 1

- B. De dieren: De DEC blijft van mening dat een fokresultaat van 50% aan de lage kant is en raadt u aan om contact op te nemen met de IvD en om samen met hen te onderzoeken wat de reden is van dit matige percentage, hoe hoog dit percentage landelijk is en welke maatregelen eventueel genomen kunnen worden om dit percentage omhoog te brengen. Daarnaast raadt de DEC u aan om de link naar het artikel van Jackson van 20 jaar geleden te verwijderen, omdat dit geen goede afspiegeling is van de huidige situatie hier.

We agree and we would of course like to increase the breeding success. We will discuss with the IVD as well as with the technicians from the animallab in order to take measures to increase that rate. The link has been removed.

- B. De dieren: De DEC raadt u aan om duidelijk in het projectvoorstel op te nemen dat het effect van valproïnezuur bij de mens meer prominent is bij mannelijke nakomelingen dan bij vrouwelijke. Bij muizen wordt het effect uitsluitend gezien bij de mannelijke nakomelingen. De term '*much more prominent*' graag wijzigen of aangeven dat het over mensen gaat. Daarnaast raadt de DEC de onderzoekers aan om toe te lichten waarom het toch een goed model is als het alleen in mannen werkt.

It has been adapted.

ASD is extremely heterogeneous in its etiology and presentation of symptoms, which gives it the umbrella term 'Spectrum Disorders'. While it is impossible for the VPA animal model of autism (or any other animal model) to recapitulate the entire set of signs and symptoms found in individuals with ASD, it is an invaluable tool for deciphering the highly-intricate functioning of the human brain and in rushing the discovery of valid treatments.

This model demonstrated many of the structural and behavioral features that can be observed in individuals with autism. These similarities enable the model to define relevant pathways of developmental dysregulation resulting from environmental manipulation. The uncovering of these complex pathways resulted to the growing pool of potential therapeutic candidates addressing the core symptoms of ASD.

Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. Exp Neurobiol. 2015

- 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 heeft voldoende samenhang.

Met de term Autisme Spectrum Stoornissen (hierna kortweg aangeduid als 'autisme') wordt een heterogeen cluster van ontwikkelingsstoornissen aangeduid dat gekenmerkt wordt door afwijkende sociale interactie, afwijkende communicatie en door stereotiep gedrag. Autisme is een veel – en steeds vaker – voorkomende aandoening die een grote invloed heeft op de kwaliteit van leven van zowel de patiënten (vaak kinderen) als hun omgeving. Verschillende omgevingsfactoren kunnen het ontstaan van autisme induceren. Een bekend voorbeeld is de maternale blootstelling aan het anti-epilepticum valproïnezuur (VPA), welke in verband gebracht wordt met de ontwikkeling van autisme in nakomelingen – zowel in mensen als in muizen. De etiologie van autisme in het algemeen, en van VPA-geïnduceerd autisme in het bijzonder, is nog niet geheel opgehelderd. Er zijn wel duidelijke aanwijzingen dat de darmflora en interacties tussen darm-immuunsysteem-hersenen hierin een belangrijke rol spelen (veel patiënten hebben ook last van een afwijkende darmfunctie). Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom in muizen nader in kaart brengen wat de invloed is van de darmflora op de ontwikkeling van autisme, en onderzoeken of het mogelijk is om het tot expressie komen van het ziektebeeld van autisme te voorkomen of te beperken door op darmniveau te interveniëren. Het project is opgedeeld in verschillende type experimenten die zowel parallel aan elkaar uitgevoerd worden als ook op elkaar volgend. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen wordt in figuur 2 uit bijlage 1 weergegeven en is in feite een combinatie van de voorbeelden 2 en 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.

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 hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen. Het uiteindelijke doel van het project is het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en [REDACTED] die de darmflora (van moeders en/of kinderen) zodanig kunnen beïnvloeden dat in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld voorkomen of beperkt kan worden. Voordat de werkzaamheid van dergelijke interventies in mensen onderzocht kan worden is het van belang dat een *proof-of-concept* en een onderbouwing van de onderliggende hypothese geleverd wordt met behulp van dierexperimenten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (moeders en kinderen), het onderzoeksveld en [REDACTED]. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een preventieve en/of therapeutische behandeling). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de [REDACTED] worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).
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 en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot interacties tussen darm-immuunsysteem-hersenen, met het beschreven diermodel en met de uit te voeren experimentele handelingen en metingen. Het feit dat het onderzoek uitgevoerd wordt in samenwerking met een klinische onderzoeksgroep die werkt op het gebied van [REDACTED] draagt bij aan de haalbaarheid en relevantie van het project.
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. Met behulp van interventies met verschillende [REDACTED] antibiotica en farmaca worden mechanistische studies uitgevoerd die fundamentele kennis opleveren over de (onderliggende mechanismen van de) invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen. De experimenten kunnen tegelijkertijd een *proof-of-concept* leveren voor de mogelijke preventieve

of therapeutische werkzaamheid van [REDACTED] In dit project wordt gebruik gemaakt van een goed gekarakteriseerd en gevalideerd model voor VPA-geïnduceerd autisme in muizen. Het project start met twee type experimenten die parallel aan elkaar uitgevoerd worden (interventies met diëten en antibiotica vanaf dracht tot na spenen). Hierna worden de meest veel belovende diëten en één antibioticum geselecteerd voor vervolggexperimenten (interventies gedurende *early life* (dat wil zeggen gedurende dracht en lactatie) en na spenen). Ten slotte worden de meest effectieve [REDACTED] geselecteerd voor de experimenten die het onderliggende mechanisme van de [REDACTED] moeten ophelderen (interventies met farmaca die aangrijpen op targets in de darm). De primaire uitleesparameters zijn: sociaal gedrag, exploratief gedrag en ruimtelijk geheugen. Secundaire uitleesparameters zijn met name gericht op de samenstelling en functie van de darmflora, op de darmpermeabiliteit en op (neuro)inflammatie.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 geldt dat zij niet meer dan licht ongerief ervaren. Het lichte ongerief is het gevolg van injecties met VPA of saline die noodzakelijk zijn in het kader van het autisme-model (moederdieren), van interventies met antibiotica die noodzakelijk zijn om veranderingen in de samenstelling van de darmflora te bewerkstelligen (moederdieren en nakomelingen), van lichte stress tijdens gedragstesten (nakomelingen), en bloedafnamen voor bepalingen van de darmpermeabiliteit (nakomelingen).
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de inductie van autisme, veranderingen in de darmflora en het uitvoeren van gedragstesten (fysieke en gedragsmatige aantasting).
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het is niet

waarschijnlijk dat dieren ten gevolge van de experimentele handelingen het humane eindpunt bereiken. Toch zijn uit voorzorg een aantal algemene criteria opgesteld waarmee het optreden van onverwacht – en niet aan het experiment gerelateerd – ongerief gemonitord kan worden. Wanneer sprake is van klinische verschijnselen die kunnen wijzen op ernstig ongerief, dan worden de dieren dagelijks gewogen en bij overmatig gewichtsverlies (meer dan 15% binnen twee dagen) geëuthanaseerd. Men gaat ervan uit dat minder dan 2% van de dieren het humane eindpunt zal bereiken.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De deels nog op te helderen interacties tussen cellen, weefsels en organen die ten grondslag liggen aan de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme – en het effect van [REDACTED] hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet volledig *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. Er zijn weliswaar *in vitro* modellen beschikbaar die bepaalde stukken van het onderliggende mechanisme (deels) kunnen nabootsen, maar ook samen zouden zij slechts een gesimplificeerde weergave van de werkelijkheid bieden, en de onderzoekers niet in staat stellen om de doelstellingen van dit project te behalen. Daar waar mogelijk is vooronderzoek met *in vitro* experimenten uitgevoerd, onder andere naar de effecten van [REDACTED] op het immuunsysteem en de flora van de darm (zie ook C15).
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. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerd vergelijkbaar onderzoek is bepaald welke groepsomvang nodig is om statistisch en biologisch significante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. De berekeningen zijn gebaseerd op gedragsparameters die door de onderzoeksgroep veelvuldig gebruikt worden als uitleesparameters voor vergelijkbare experimenten. Waar mogelijk worden experimenten met elkaar gecombineerd, zodat het aantal controlegroepen gereduceerd kan worden. Op basis van resultaten uit *in vitro* onderzoek zijn de meest veelbelovende (combinaties van) [REDACTED] geselecteerd voor de te onderzoeken [REDACTED]. Daarmee wordt het benodigde aantal experimentele groepen tot een minimum gereduceerd. In de ogen van de DEC zou het wenselijk zijn om het huidige foksucces van 50% te verhogen, zodat het benodigde aantal proefdieren verder gereduceerd kan worden (zie E3).
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 onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen en metingen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de fok die beschreven wordt in bijlage 1 worden dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet. Voor de feitelijke experimenten in bijlage 1, welke uitgevoerd worden met de nakomelingen, zullen alleen mannelijke dieren gebruikt worden, omdat zich in het VPA-model het autisme-fenotype uitsluitend in mannelijke nakomelingen manifesteert. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager met dit argument in voldoende mate heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, niet anders kan dan de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden met behulp van uitgebreide analyse van onder andere darm- en hersenweefsel. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het directe doel van het project (het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen) en het uiteindelijke doel (het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en ██████████ die in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld kunnen voorkomen of beperken), gezien de hoge waarschijnlijkheid dat de doelstellingen behaald worden, het lichte ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel. Waarden die voor het onderzoeksveld en de ██████████ worden bevorderd: gering voordeel. Waarden die voor de doelgroep worden bevorderd: veel voordeel. De DEC is van mening dat de belangen van de doelgroep in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Het feit dat de belangen voor de onderzoeksgroep en de ██████████ door dit project worden bevorderd speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project fundamentele kennis opleveren over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme. De samenleving zou erbij gebaat zijn wanneer farmacologische en/of ██████████ beschikbaar komen

waarmee in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld voorkomen of beperkt kan worden. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden, en de onderzoekers doen er alles aan om ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen met als uiteindelijke doel het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en [REDACTED] die in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld kunnen voorkomen of beperken. De DEC is van mening dat de belangen van de doelgroep zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Het beschreven muizenmodel stelt de onderzoekers in staat de doelstellingen van het project te behalen, maar heeft als beperking dat enkel mannelijke nakomelingen gebruikt kunnen worden. Toch ondersteunt de DEC de keuze voor het VPA-model, omdat de kwaliteit van het model en de transleerbaarheid van resultaten in de ogen van de DEC opweegt tegen het nadeel van het gebruik van één geslacht. Daarnaast acht de DEC het gebruik van enkele mannelijke dieren gerechtvaardigd, omdat het voorliggende project in feite een *proof-of-principle* is. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief en het aantal dieren tot een minimum te beperken. De DEC hecht er wel waarde aan dat de onderzoekers samen met de IvD onderzoeken of en op welke wijze het huidige foksucces van 50% verhoogd kan worden (zie E3). Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het lichte ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat de doelstellingen het gebruik van proefdieren rechtvaardigen.

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. Het volgende dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies: de DEC is van mening dat een foksucces van 50% aan de lage kant is. De DEC heeft de onderzoeker geadviseerd om samen met de IvD te achterhalen of en op welke wijze het foksucces verhoogd kan worden.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017827	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x			x		
4	Bijlage animal procedure 1				x			x		
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6	Mail verzoek om aanvulling pdf				x		x	x		
7	DEC advies				x			x		
8	Advies CCD		x						x	
9	Beschikking en vergunning				x		x	x		

17 JAN. 2017



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	11500
		<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	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>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		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.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het *aanvraag* formulier
- 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 - 1 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 1 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van de ELANA techniek
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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

Melding Machtiging

Appendix voor bij de aanvraag

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





Instantie voor
Dierenwelzijn
Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk
ons kenmerk

datum 12 januari 2017
onderwerp Aanvraag projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA Utrecht. Bij e-mail correspondentie graag info@ivd-utrecht.nl in cc plaatsen.

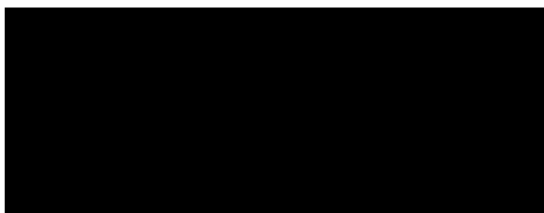
Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. Ik wil u vriendelijk doch dringend verzoeken op de factuur **onderstaand factuuradres te gebruiken** en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

Factuuradres

UU -ASC
postbus 80.011
3508 TA Utrecht
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur alleen digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres: info.ascf@uu.nl. Graag info@ivd-utrecht.nl in CC plaatsen.





Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Tijdens dit project gaan we onderzoek doen naar de ontwikkeling van een simpelere, veiligere en

makkelijkere versie van de huidige ELANA techniek. De ELANA techniek is een techniek die speciaal ontwikkeld is voor afwijkingen van de bloedvaten in het hoofd. Om de patiënten te kunnen behandelen moeten de chirurgen worden opgeleid.

De ELANA techniek is een bypass techniek in het hoofd waarbij het ontvangende vat niet afgesloten hoeft te worden tijdens het maken van de ELANA anastomose. Dit is een unieke methode. Bij deze methode wordt er een donorvat uit het been gehaald, dit vat wordt met 8 hechtingen aan de ELANA ring gemaakt. Deze ring met daaraan het donorvat wordt met 8 hechtingen op het ontvangende vat in het hoofd vastgemaakt. Daarna komt er een laser die door het donorvat wordt geschoven en een gat maakt in het ontvangende vat. Dit wordt gedaan terwijl de bloedstroom niet wordt onderbroken. Deze techniek wordt toegepast op bloedvaten in het hoofd die soms wel 9 cm diep liggen. Deze techniek is echter alleen toepasbaar bij bloedvaten met een diameter van 3 mm (dit zijn de grootste diameters bloedvaten in het hoofd). Om een duidelijker beeld te krijgen zie de extra bijgevoegde bijlage en het filmpje op de website <http://www.elana.com>.

Sommige mensen hebben een afwijking aan de bloedvaten. Dit kan bijvoorbeeld voorkomen in het hoofd. De bloedvaten in het hoofd zijn zeer moeilijk te bereiken, bij beschadiging van de hersenen kan er uitval van één of meer gebieden plaatsvinden. Zo'n afwijking kan bijvoorbeeld een aneurysma zijn, dit is een uitstulping in de wand van een slagader. Er kan ook door meerdere oorzaken een beschadiging van de vaatwand optreden (verkalking, ophoping van cholesterol, stolselvorming, etc.) wat een slechte doorbloeding of zelfs afsluiting tot gevolg heeft (ischemie: onvoldoende doorbloeding).

Van alle volwassenen heeft 3% een hersenaneurysma, dit komt neer op 300.000 mensen in Nederland (Bron: <https://www.vriendenumcutrecht.nl/Projecten/hersenen/hersensbloeding/?gclid=CPbf-Yqv5s8CFeXbcgodcmcL2A>). Wereldwijd sterven er bijna 500.000 mensen aan een aneurysma (Bron: <http://www.brainaneurysm.com/TopStories/exec/didyouknow>). In 2014 overleden in Nederland 9.383 personen als gevolg van een beroerte (verstoring van doorbloeding van de hersenen) (Bron: <https://www.volksgezondheidszorg.info/onderwerp/beroerte/cijfers-context/sterfte#!node-sterfte-beroerte-naar-type>). De bloedvaten in het hoofd zijn zeer moeilijk te bereiken en daardoor zijn lang niet alle patiënten te behandelen.

Een aneurysma in de hersenen bevindt zich meestal op de splitsing van twee slagaders, meestal aan de onderkant van de hersenen of hersenstam. Als een aneurysma te groot wordt kan deze gaan scheuren en zal er een hersenbloeding ontstaan. Een aneurysma wordt vaak pas vastgesteld na het ontstaan van verschillende symptomen. Een groot aneurysma kan neurologische uitval- of prikkelingsverschijnselen veroorzaken zonder te bloeden, doordat het aneurysma als een gezwel tegen de hersenen, de hersenstam of de hersenzenuwen aandrukt. Een aneurysma kan worden verholpen met clipping of coiling. Bij clipping wordt er een klemmetje op de hals van het aneurysma geplaatst, zodat de bloedtoevoer naar de uitstulping is afgesloten. Als dat gebeurt kan er geen bloeding van het aneurysma meer optreden (Bron: The effect of coiling versus clipping of ruptured and unruptured cerebral aneurysms on length of stay, hospital cost, hospital reimbursement, and surgeon reimbursement at the shands healthcare neurovascular center at the university of florida; Hoh B.L.; Neurosurgery, feb 2009). Bij coiling wordt een vaatkatheter via de liesslagader naar de monding van het aneurysma gebracht. Via deze katheter worden spiraaltjes van platina in het aneurysma gebracht, die daarin opkrullen en de holte van het aneurysma geheel opvullen, waardoor deze afgesloten is van de bloedtoevoer en niet meer opnieuw kan gaan bloeden. De platina draad vult het aneurysma. Hierdoor verandert de bloedstroom, waardoor het aneurysma tromboseert (Bron: Surgery following endovascular coiling of intracranial aneurysms; Thornton J.; Surg. Neurol. 54: 352-60, 2000). In 1-3 % van de gevallen kan een aneurysma niet met clipping of coiling behandeld worden. Redenen hiervoor zijn bijvoorbeeld: 1. een te groot aneurysma (groter dan 2.5 cm), 2. een aneurysma te diep in de hersenen ligt, 3. de hals van het aneurysma te breed is, 4. er komen zijtakjes uit het aneurysma of 5. het aneurysma te kwetsbaar is. Bij 1-3% van de patiënten is clipping of coiling niet mogelijk en dan is een bypass is dan het laatste redmiddel. Bij een bypass wordt langs het aneurysma een vaatomleiding aangebracht, waarlangs de aanvoer van zuurstofrijk bloed plaats kan vinden. Clipping en coiling zijn goede behandelopties voor

oppervlakkige vaten, maar niet toe te passen bij dieper gelegen vaten. De conventionele bypass is een goed alternatief, maar hierbij moet het vat worden afgesloten, waardoor onder andere zuurstoftekort kan ontstaan. De beste methode is om een bypass te maken, zonder dat het bloedvat wordt afgesloten maar waarbij het aneurysma wel kan worden verwijderd. Deze eigenschappen heeft de ELANA techniek. ELANA staat voor Excimer Laser Assisted Non-occlusive Anastomosis. De ELANA anastomose techniek is bedacht en ontworpen door het team van professor C.A.F. Tulleken van de afdeling Neurochirurgie aan het UMC Utrecht.

De ELANA techniek vereist een perfecte hechttechniek van de uitvoerder. Toch kan de ELANA techniek niet altijd worden toegepast. Er zijn dus nog steeds patiënten onbehandelbaar. Er is dus nog verbetering van de ELANA techniek mogelijk. De toekomst van de ELANA techniek is vooral gericht op het creëren van een veiligere en makkelijkere manier om een anastomose te plaatsen. Tevens moet de techniek sneller zijn en meer geschikt voor andere gebieden in de hersenen.

Een van de ideeën om op een veiligere en makkelijkere manier een bypass te maken is de ELANA techniek te versimpelen, bijvoorbeeld door de hechtingen die in het hoofd worden geplaatst te vervangen door iets anders. Door deze manier van denken is de ELANA Clip ontstaan, dit is een ring met daaronder 2 pootjes. Deze pootjes worden in het ontvangende vat geschoven en vervangen dus de 8 zeer moeilijke hechtingen in het hoofd. De ELANA Clip is een vervanger van de ELANA ring. Om de ELANA Clip techniek meer toepasbaar te maken op meerdere vaten (met allen een verschillende diameter) in het hoofd, willen we een device voor meerdere diameters bloedvaten in het hoofd ontwikkelen.

Om een duidelijker beeld te krijgen van de bestaande en de vernieuwde ELANA Clip techniek zie bijgevoegde bijlage.

De huidige ELANA techniek heeft een aantal nadelen. Zo zijn er 8 hechtingen in het hoofd nodig welke zeer nauwkeurig moeten worden geplaatst en wat zeer tijdrovend is. Tevens is dit zeer moeilijk waardoor een training in deze techniek noodzakelijk is. De techniek kan alleen worden toegepast op een bloedvat met een diameter van 3 mm waardoor lang niet alle patiënten kunnen worden behandeld.

Met de ELANA Clip techniek zijn er een stuk minder of misschien wel geen hechtingen nodig wat de aansluiting van het donorvat op het ontvangende vat een stuk makkelijker en veiliger en minder (kostbare) tijd kost. Het device wordt afgeschaald (downsizen) waardoor er een grotere range aan diameters bloedvaten kan worden behandeld. Hierdoor zijn er meer patiënten te behandelen want de toepasbaarheid is groter.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is om patiënten met een afwijking in de bloedvaten in de hersenen, waarvoor geen behandelmethode beschikbaar is te kunnen behandelen. Dit willen we doen door de huidige ELANA techniek te verbeteren en toepasbaar te maken op bloedvaten met verschillende diameter in het hoofd. Deze studie zal antwoord geven op de volgende vragen:

- Hoe goed past het nieuwe ELANA device op de bloedvaten met verschillende diameters?
- Wat zijn de effecten van bloed op het nieuwe ELANA Clip device?
- Zal het nieuwe ELANA device lekvrij zijn en hoe ziet de gemaakte opening eruit?

De kans dat de studie binnen de aangegeven tijdspad slaagt, is groot aangezien we bij de ontwikkeling en het uitvoeren van de testen niet afhankelijk zijn van externe partijen. Dit project wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep die zelf ook de ELANA techniek (mede) heeft ontwikkeld. We zullen per diameter bloedvat een Clip device ontwikkelen waardoor er per diameter bloedvat een device wordt gereedgemaakt voor de in vivo studie. Ook de in vivo studie zullen we zelf uitvoeren. We beschikken

over de juiste kennis en expertise om een range aan Clip devices te ontwikkelen en testen in een tijdspad van 5 jaar.

Een tweede hoofddoel is om meer chirurgen de bestaande ELANA techniek te leren. Dit willen we doen door chirurgen vanuit de hele wereld cursus te geven en op te leiden tot het zelfstandig uitvoeren van deze zeer complexe techniek. Enkele malen per jaar wordt er een ELANA cursus gegeven waarbij de neurochirurgen een uitgebreide ex vivo training krijgen in het lab. In deze ex vivo lab setting wordt de techniek uitvoering getraind en worden er meerdere bypasses gemaakt. Zodra de cursist bekwaam is in de techniek zal de techniek worden geoefend op een levend dier. Oefening op een levend dier bootst meer de werkelijkheid na dan een ex vivo experiment. Door het in vivo gedeelte van deze training zijn de neurochirurgen meer voorbereid op de operatie bij een mens.

Dit project bestaat uit 2 deelvragen die er samen voor zorgen dat de techniek haalbaar wordt in het ziekenhuis. Zoals bij 3.1 in de achtergrond staat beschreven is de ELANA techniek een zeer moeilijke hechttechniek. Om deze techniek meer toepasbaar te maken over de hele wereld is er een uitvoerige training nodig. Chirurgen moeten worden opgeleid om zelfstandig deze techniek te kunnen uitvoeren. Tevens geven deze chirurgen veel input betreffende de ideale manier van gebruik. Wat moet er verbeterd worden, wat moet er makkelijker? Deze vragen verwerken we in de nieuwe Clip techniek. Een verbetering en versimpeling van de techniek zorgt ervoor dat er meer chirurgen deze techniek kunnen leren, hierdoor kunnen meer patiënten worden behandeld.

3.3 Belang

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

Het maatschappelijk belang is zeer groot omdat er patiënten die voorheen niet te behandelen waren nu wel een behandeling kunnen krijgen. Door de huidige techniek aan te passen/uit te breiden en chirurgen goed te trainen kunnen patiënten van over de hele wereld geholpen worden. Zoals in 3.1 te lezen is, is het sterftecijfer wereldwijd bijna een half miljoen per jaar. Door de techniek meer toepasbaar te maken op verschillende diameters bloedvaten kunnen er dus veel meer patiënten behandeld worden. Zodra er meer patiënten zijn waar een behandeling voor is, zullen er meer chirurgen zich deze techniek eigen willen maken. Wat een gunstig effect heeft op het sterftecijfer wereldwijd. Het wetenschappelijk belang is zeer groot. Er zijn niet alleen vaatafwijkingen, zoals aneurysmata (verwijdingen) in het hoofd maar dit soort afwijkingen zijn op meerdere plaatsen in het lichaam te vinden. Zo zijn er vaker vaatafwijkingen op en rondom het hart en in de buikholte. Met de inzichten die wij krijgen door onderzoek te doen naar de verschillende diameters bloedvaten in het hoofd kunnen we andere disciplines ondersteunen met hun onderzoek. De resultaten zullen worden gedeeld en er zou een samenwerking kunnen ontstaan met een andere afdeling dan de neurochirurgie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Dit project bestaat uit een in vitro, ex vivo en een in vivo gedeelte. In dit project willen we per diameter bloedvat een bijpassend device maken. In het hoofd zijn er veel voorkomende diameters van de bloedvaten en daarom zijn die als uitgangspunten gekozen. Om niet voor elke diameter bloedvat een apart device te maken willen we devices ontwikkelen die te gebruiken zijn in bloedvaten die binnen een range vallen. De ranges zijn [redacted]. We beginnen met de derde maat omdat deze qua maatvoering aansluit op de al bestaande ELANA hechttechniek.

De ELANA Clip techniek bestaat uit 3 onderdelen, de Clip, de Laser Catheter en een manier om de clip en de catheter tijdelijk aan elkaar te bevestigen. Deze onderdelen worden elk afzonderlijk uitvoerig getest m.b.v. in vitro en ex vivo experimenten. Per diametergroep (1 device per diameter) gaat dit om ongeveer 1500 experimenten. Daarna wordt er in het lab een combinatie van de 3 onderdelen samen getest. Per groep gaat dit om honderden experimenten. De combinatie, het device, wordt uitvoerig

getest op verschillende eigenschappen, zoals de verhouding bloedvat en device, lekkage van het device, lekkage van de anastomose en hoe ziet de opening eruit (raffelig, glad, open, dicht). Er wordt op het ontvangende vat een opening gelaserd. Er wordt gecontroleerd of het flapje (rondje van de bloedvatwand wat eruit gelaserd is) helemaal los is of nog voor een gedeelte vast is en hoe dit zogenoemde flapje eruit ziet. Om de ex vivo experimenten te kunnen verifiëren zijn de konijnen experimenten nodig. In de ex vivo experimenten wordt het device, de 3 onderdelen, getest op konijnenvaten die gehaald zijn in een consumptieslachterij. In de testopstelling staat op deze bloedvaten een standaard druk van 100 mmHg. Deze druk is vergelijkbaar met de druk in het hoofd, echter simuleren we dit met water. Tijdens de ex vivo experimenten kunnen we alle facetten van het device al testen, alleen niet hoe het device zich verhoudt in combinatie met bloed. Het gaat om hele kleine onderdeeljes waar bloed in/tussen kan gaan zitten en de techniek toepassen in een levend dier is anders dan op een statisch model. Dit kan een dusdanig ander resultaat geven dat er een verificatie met bloed nodig is.

Het in vivo gedeelte bestaat uit een []-tal reeksen [] die geverifieerd moeten worden. Deze reeksen zullen elk afzonderlijk getest worden, zodat er maar 1 device per konijn getest wordt. Eerst wordt range [] getest om daarna elk afzonderlijk de andere [] ranges te testen. Er kunnen op de [] anastomoses per konijn worden gemaakt (wordt gebruikt voor de [] grote ranges) en op de [] en [] anastomoses per konijn (wordt gebruikt voor de [] kleinste ranges).

De ELANA techniek is bedacht door Prof Tulleken in het UMC Utrecht. Deze techniek kan patiënten over de hele wereld redden maar de neurochirurgen moeten een zeer intensieve cursus ondergaan voordat ze patiënten mogen behandelen. Deze cursus vindt hoofdzakelijk plaats in het lab, daarnaast is er 1 dag waarbij de cursist de ELANA techniek oefent op de [] van een konijn. Tijdens deze cursus worden er [] anastomoses op de [] van het konijn geplaatst. Er zijn naar verwachting 5 cursussen per jaar waarbij elke cursus 2 cursisten heeft.

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

Er wordt 1 soort proefdier gebruikt, namelijk het New Zealand White konijn. Het konijn zal een gewicht hebben van minstens 3 kg. Per dier zullen er [] anastomoses gemaakt worden. Voor de grotere diameters [] zal de [] voldoen aan de gespecificeerde diameter als ontvangend vat. Voor de kleinere diameters [] zullen de [] en [] worden gebruikt. Na het experiment zal het konijn worden getermineerd met een overdosis euthasaat en de bloedvaten waarop de anastomoses zijn gemaakt zullen worden uitgehaald. Deze anastomoses worden naderhand in het lab gronding bekeken.

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

Het is vanuit de kliniek gewenst om een zo breed mogelijk spectrum aan diameter bloedvaten te kunnen behandelen met een bypass. De uitgangspunten zijn: 1.5 [] bloedvaten. We beginnen met de maatvoering van [] omdat deze aansluit op de maatvoering van de al bestaande ELANA ring techniek. Daarna zal het spectrum worden verbreed en dus met een kleinere diameter worden gestart.

De verschillende groepen staan qua go/no go moment los van elkaar. Hoe groter de opening van de anastomose is hoe groter de kans is dat deze open blijft. Het open blijven van de anastomose, lekvrij zijn en hoe de opening eruit ziet worden al uitgebreid getest tijdens de ex vivo experimenten en voor deze in vivo experimenten zal het go/no go moment al bij de ex vivo experimenten zijn. De in vivo experimenten zullen een verificatie zijn van de ex vivo experimenten.

De twee doelstellingen zorgen er samen voor dat de techniek haalbaar wordt in het ziekenhuis. De huidige ELANA techniek vereist een zeer moeilijke hechttechniek. Om te kunnen zorgen dat deze techniek gemakkelijk toepasbaar wordt, is er een uitvoerig onderzoek nodig waarmee de techniek kan worden vereenvoudigd. Om de patiënten te kunnen helpen moeten chirurgen worden opgeleid om

zelfstandig de techniek uit te kunnen voeren. Tijdens deze cursussen geven de chirurgen belangrijke input over de ideale gebruikswijze van de techniek wat zorgt voor belangrijke feedback. Op deze manier is ook het nieuwe ontwerp , de clip, ontstaan. We zullen deze techniek eerst zelf uitwerken en testen voordat we de chirurgen ermee zullen trainen.

Op deze 2 manieren beïnvloeden beide doelstellingen elkaar en zijn ze beide nodig om de ELANA techniek optimaal te verbeteren.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de ELANA techniek
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.	11500	
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
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de ELANA techniek

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit project bestaat uit een in vitro en een in vivo gedeelte. In dit project willen we voor verschillende diameters bloedvat een bijpassend device maken. Om niet voor elke diameter bloedvat een apart device te maken willen we devices ontwikkelen die te gebruiken zijn in bloedvaten die binnen een range vallen. De ranges: [REDACTED]. We beginnen met de derde maat omdat deze qua maatvoering aansluit op de al bestaande Elana hechttechniek.

De ELANA Clip techniek bestaat uit 3 onderdelen, de Clip, de Laser Catheter en een manier om de clip en de catheter tijdelijk aan elkaar te bevestigen. Deze onderdelen van de techniek worden elk afzonderlijk uitvoerig in vitro getest. De in vitro experimenten worden uitgevoerd in een trainingsdevice (The excimer laser-assisted nonocclusive anastomosis practice model: Development and application of a tool for practicing microvascular anastomosis techniques; Streefkerk H.J., Bremmer J.P.; neurosurgery 58 ONS suppl 1]: ONS 148 – ONS 156, 2006; en zie appendix) waarbij in de bloedvaten (gehaald uit een consumptieslachterij) een druk is nagebootst met water. Deze druk is in te stellen en zowel statisch als pulserend te maken.

Per diametergroep (1 device) gaat dit om ongeveer 1500 experimenten. Daarna wordt er in het lab een combinatie van alle 3 de onderdelen samen getest. Per groep gaat dit om honderden experimenten. De combinatie, het device, wordt uitvoerig getest op verschillende eigenschappen, zoals de verhouding bloedvat en device, lekkage van het device, lekkage van de anastomose en hoe ziet de opening eruit.

Tijdens de ex vivo experimenten kunnen we alle facetten van het device al testen, alleen niet hoe het device zich verhoudt in combinatie met bloed. Het gaat om hele kleine onderdeeljes waar bloed in/tussen kan gaan zitten. Indien het bloed een stolseltje vormt waar dat niet mag (bijvoorbeeld in de catheter of tussen het clipje en het ontvangende vat) kan dit een heel ander resultaat geven. Om de ex vivo experimenten te kunnen verifiëren zijn de konijnen experimenten nodig. Het device in combinatie met bloed geeft een dusdanig ander resultaat dan met water dat een verificatie nodig is.

Het in vivo gedeelte bestaat uit een []-tal reeksen die geverifieerd moeten worden. Per diametergroep bloedvat is een verificatie van [] nodig. Op de [] kunnen er [] anastomoses per konijn worden gemaakt en per konijn [] op de [] en []. Dit betekent [] konijnen per groep, wat het totaal op [] konijnen brengt voor deze experimenten. Er zal 1 type device worden getest per konijn, er zullen dus experimenten gedaan worden of op de [] of op de [] en [].

Als primaire uitkomstparameters tijdens de in vivo studie wordt er gekeken naar:

- Hoe schuift/prikt het clipje in het ontvangende bloedvat
- Past het clipje goed op het ontvangende vat (qua verhoudingen)
- Lekt de anastomose na inprikken clipje
- zit er bloed tussen device en bloedvat. Zo ja, hoeveel bloed zit er tussen clip en bloedvat en tussen catheter en bloedvat
- Kan er een opening gemaakt worden.
- Hoe ziet de opening eruit

Bovenstaande vragen worden ook in de in vitro experimenten getest. Echter gaat het in een levend dier om het contact met bloed en het functioneren van de circulatie van het dier. Het gaat om hele kleine onderdeeljes waar bloed in/tussen kan gaan zitten en de techniek toepassen in een levend dier is anders dan op een statisch model. De in vivo verificatie is geslaagd als er uit de resultaten blijkt dat er een opening gemaakt kan worden die er glad uitziet (niet rafelig) en dat het bloed wat in contact komt met de verschillende onderdelen van het device niet verstopt raken of disfunctioneren door het bloed. Tevens moet het device qua verhoudingen goed passen op het ontvangende bloedvat.

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.

1. Het konijn wordt onder anesthesie gebracht.
2. De buik voor benadering van de [] en [] voor benadering van de [] wordt opengelegd.
3. De Elana Clip wordt bevestigd aan het donorvat
4. Het donorvat met daarna de Elana Clip worden in het ontvangende bloedvat [] geplaatst
5. De opening van de anastomose wordt gemaakt
6. Na het plaatsen van alle [] de anastomoses wordt er een overdosis euthasaat toegediend
7. Het ontvangende bloedvat [] wordt met de daarop geplaatste devices uitgehaald. Deze anastomoses worden naderhand in het lab grondig bekeken. Er wordt ex vivo gekeken naar hoe de gelaserde opening eruit ziet en of er een flapje is behaald.

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

We hebben bepaald dat er een minimale sample size van [] nodig is, 2 tailed test met een set van 0.05 en een power van 90%.

De N=60 is nodig per groep, dus per te testen diameter []

Tijdens de cursus van de neurochirurgen worden er [] anastomoses op de [] van het konijn geplaatst. Er zijn naar verwachting 5 cursussen per jaar (1 a 2 personen per cursus). Uit ervaring en feedback van de docent is er gekozen voor 1 dier per 1 a 2 cursisten, afhankelijk van het aantal cursisten per cursus. We willen [] konijnen per jaar, voor dit projecttermijn van 5 jaar, een totaal van [] konijnen ten behoeve van training aanvragen.

B. De dieren

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

Er wordt 1 soort proefdier gebruikt, namelijk het New Zealand White konijn van een erkende leverancier. Voor deze studie kunnen zowel mannelijke als vrouwelijke konijnen worden gebruikt. De konijnen worden besteld op gewicht en zullen een gewicht hebben van minstens 3 kg. De diameter van de [] en de eigenschappen (wanddikte, structuur komen zeer goed overeen met de [] in het menselijke brein. Daarom is het konijn als diermodel gekozen voor zowel de in vitro als de in vivo gedeelte.

Per dier zullen er [] anastomoses gemaakt worden. Voor de grotere diameters devices [] en voor de cursus zal de [] voldoen aan de gespecificeerde diameter. Voor de kleinere diameters [] zullen de [] worden gebruikt. Na het experiment zal het konijn worden getermineerd met een overdosis euthasaat en de bloedvaten waarop de anastomose is gemaakt zullen worden uitgehaald. Per diametergroep worden 1 device getest waarbij er [] anastomoses gemaakt worden, wat neerkomt op [] konijnen per diametergroep. Het totaal aantal konijnen voor deze studie zal daarbij komen op [] konijnen [] voor het onderzoek en [] konijnen voor de training.

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.

Tenzij de konijnen reeds zijn geopereerd of vasculair zijn onderzocht

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 verschillende onderdelen van de ELANA clip techniek worden afzonderlijk uitvoerig getest met ongeveer 4500 ex vivo experimenten. Vervolgens worden verschillende onderdelen, het device, samen gevoegd met nogmaals honderden ex vivo experimenten. Tijdens de in vivo studie is er ook rekening gehouden met vermindering, daarom worden er per konijn [] anastomoses geplaatst.

Er is dus een hele grote vermindering van het aantal dieren dat nodig is. Om alleen al de Elana Clip en laser catheter te testen zijn er ongeveer 6000 experimenten nodig, dit zijn duizenden konijnen die hierdoor niet nodig zijn. Om de combinatie van de Clip en laser catheter te testen zijn er naar schatting 800 experimenten nodig. Dit brengt een totaal van ongeveer 6800 experimenten die worden uitgevoerd met een in vitro opstelling.

De ex vivo experimenten worden uitgevoerd op konijnen [] die we verkrijgen uit een consumptie slachthuis. We kunnen de situatie op deze manier nabootsen door water door het bloedvat te laten stromen in plaats van bloed in het konijn. Deze manier van werken levert ons al heel veel resultaten op en aan de hand van deze bevindingen kunnen we de devices verder optimaliseren. Echter is de overgang van in vitro opstelling naar de mens te groot. Om de overgang te verkleinen is het noodzakelijk dat de veiligheid en kwaliteit van het device in een levend organisme, waarbij andere systeemhuishoudingen komen kijken, wordt getest. Om de overgang te verkleinen is er een verificatie in een levend dier nodig. De verificatie in een levend dier is nodig om de vertaalslag te kunnen maken naar de mens.

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

De dieren krijgen de gehele procedure anesthesie. Na de procedure krijgt het konijn een overdosis euthasaat. Het zijn allen acute experimenten, de dieren zitten voordat het experiment aanvangt in groepsverband in een verrijkte kooi

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

We zijn het enige onderzoekscentrum in de wereld die onderzoek doet naar de Elana techniek. Hierdoor weten we zeker dat de experimenten nog niet eerder zijn uitgevoerd. Deze patientengroep valt in een niche markt, waardoor er weinig tot geen onderzoek wordt gedaan naar alternatieve behandelmethoden.

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.

Het is een terminaal experiment waarbij pijnverlichtingsmedicatie wordt toegepast tijdens de inleiding en algehele anesthesie

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voor aanvang van het experiment zitten de konijnen in groepsverband. Het zou kunnen zijn dat de konijnen solitair worden gehuisvest dit zou een kleine vorm van ongerief kunnen veroorzaken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak voor het eventueel solitair huisvesten kan vanwege het vechten zijn of omdat het het laatste konijn is van die kooi

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

We proberen de dieren alleen in uiterste nood te scheiden en laten die situatie zo kort mogelijk duren door eventueel de planning en keuze van dieren aan te passen.

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.

Terminaal

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.

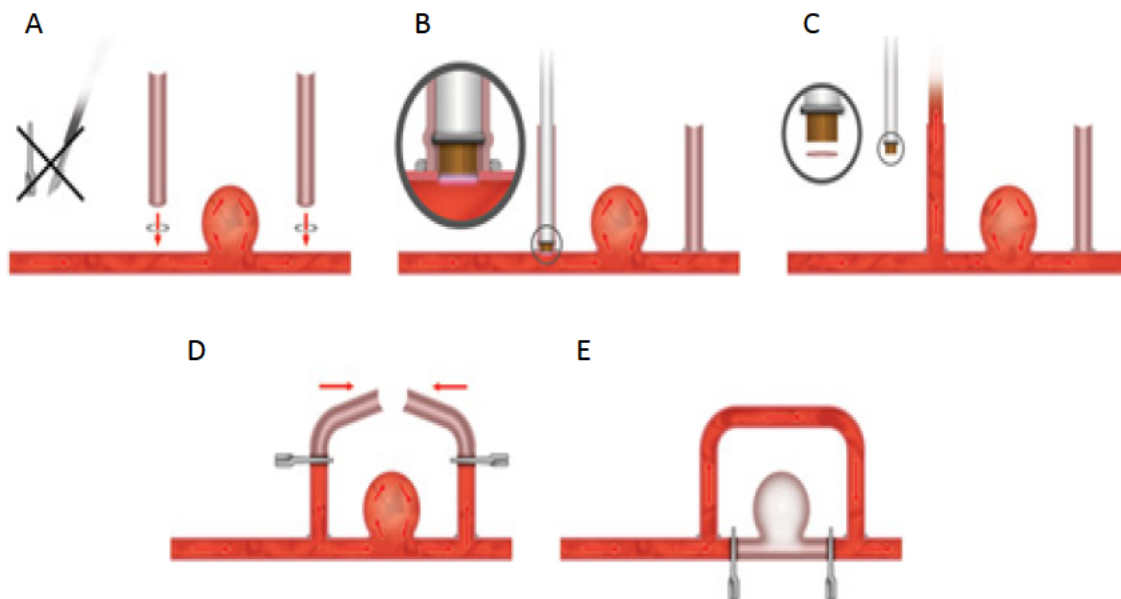
Het betreft een terminaal experiment. Na afloop van het experiment zal het ontvangende bloedvat met de daarop gemaakte anastomoses worden uitgehaald. Dit ontvangende vat wordt in het lab uitvoerig geanalyseerd.

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.

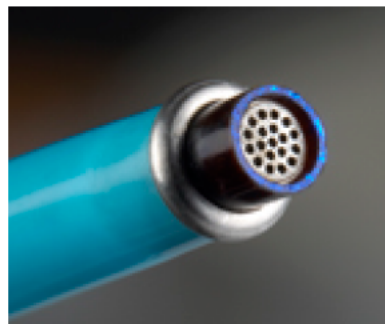
Ja

ELANA techniek



Figuur 1 ELANA Techniek

Bij de ELANA techniek wordt er een donorvat gebruikt. Bij de mens wordt hiervoor een ader uit het been gehaald. Op het donorvat wordt het ringetje met 8 hechtingen vastgemaakt. Dit ringetje is er om de katheter in de goede positie te zetten en te houden. Het ringetje zorgt voor een plat oppervlak op de vaatwand, hierdoor kan de laser makkelijker door de vaatwand gaan. Het donorvat met het daaraan vastzittende ringetje wordt vervolgens op het ontvangende vat geplaatst. Het donorvat wordt met 8 hechtingen vastgezet aan het ontvangende vat. Van deze 8 hechtingen gaan er 4 hechtingen om het ringetje heen. Daarna worden er 4 hechtingen geplaatst om het vat waterdicht te maken. Met een katheter wordt er een opening gelaserd, zodat het bloed door het donorvat kan stromen (B en C). Er wordt op het donorvat een klem geplaatst (D). Nadat de uiteinden van de donorvaten aan elkaar zijn gehecht, worden de klemmen losgelaten. Het ontvangende vat wordt nu afgesloten tussen en de bypass is compleet (E).

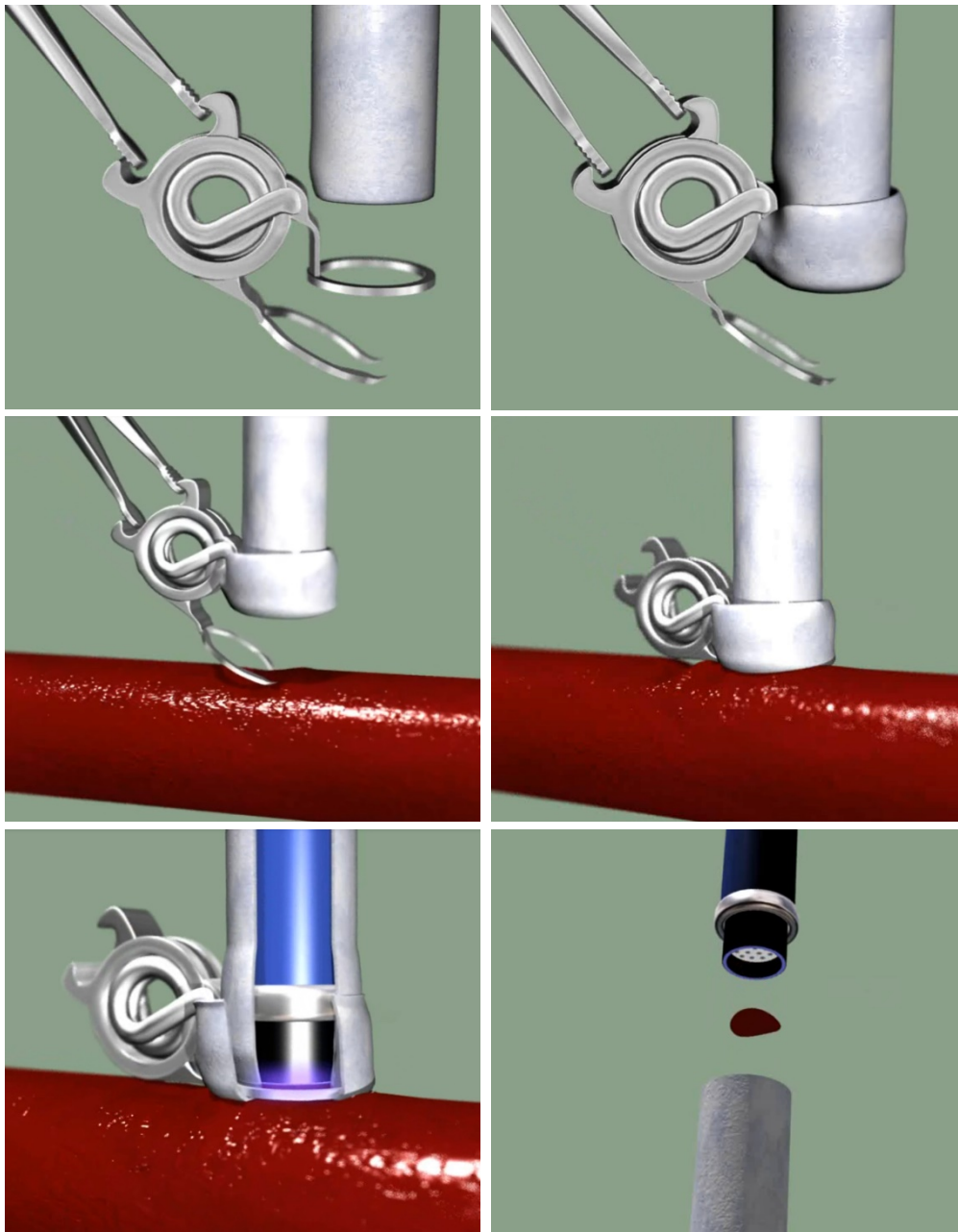


Figuur 2 2.8 mm platina ring

Links: Het platina ringetje is ontworpen omdat de katheter tip geen goed contact maakte op het ontvangende vat.

Rechts: De kathetertip die gebruikt wordt tijdens het laseren.

ELANA Clip techniek



Figuur 3 ELANA Clip Techniek

De ELANA Clip is een versimpelde versie van de ELANA techniek. De Clip bestaat uit een ring en daaronder 2 pootjes, deze kunnen mbv een veermechanisme open en dicht. De ring heeft dezelfde functie als bij de ELANA techniek. Er wordt er een donorvat gebruikt, welke om het ringetje van de clip wordt geschoven. De twee pootjes van de clip worden in het ontvangende vat geschoven. Met een catheter wordt er een opening gelaserd, zodat het bloed door het donorvat kan stromen. Het donorvat wordt tijdelijk afgeklemd, terwijl het bloed in het ontvangende vat gewoon blijft stromen. Nadat de uiteinden van de donorvaten aan elkaar zijn gehecht, kunnen de klemmen worden verwijderd. Het ontvangende vat wordt afgesloten en de bypass is compleet.



Figuur 4 Trainingsdevice

In dit figuur is het trainingsdevice zichtbaar. In dit in vitro model is een bloedvat opgespannen tussen de twee pinnetjes. Door het vat stroomt water met een bepaalde druk (meestal 100 mmHg). De druk kan worden aangepast aan de wensen van de onderzoeker. Het ontvangende vat wordt standaard 10% uitgerekt. Het donorvat is op het opgespannen ontvangend vat gehecht. (Bron: The excimer laser-assisted nonocclusive anastomosis practice model: Development and application of a tool for practicing microvascular anastomosis techniques; Streefkerk H.J., Bremmer J.P.; neurosurgery 58 ONS suppl 1]: ONS 148 – ONS 156, 2006)



> 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
AVD115002017827

Bijlagen

2

Datum 18 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 januari 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002017827. 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:

18 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD115002017827

Datum:
18 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002017827

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

Datum:
18 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002017827

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2022
Titel project: Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van de ELANA techniek
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 11 januari 2017

Datum:
18 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002017827



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
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
AVD115002017827
Bijlagen
2

Datum 18 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 18 januari 2017
Vervaldatum: 17 februari 2017
Factuurnummer: 170827
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002017827	€ 1035,-

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: dinsdag 7 februari 2017 8:41
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij debehandeling dossier AVD115002017827

Beste [REDACTED]

Hartelijk dank voor de aanvullingen. Zoals gezegd wordt de aanvrag op 17 februari 2017 door de CCD besproken. In de daaropvolgende week hoort u het besluit van de CCD,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 8:29
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij debehandeling dossier AVD115002017827

Beste mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw mail gericht aan [REDACTED] (zie onderstaande mail) stuur ik u de aangepaste versie van de niet technische samenvatting.

[REDACTED] heeft mij gevraagd de opmerkingen te verwerken en de aangepaste versie te retourneren.

Mochten er nog vragen zijn, dan hoor ik het graag

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
3584 CM, Utrecht
The Netherlands

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: woensdag 1 februari 2017 16:09
Aan: [REDACTED]

CC: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Onderwerp: vraag bij debehandeling dossier AVD115002017827

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij een paar opmerkingen over de Niet Technische Samenvatting en willen wij u vragen om een herziene versie in te dienen. Het betreft uw project: 'Onderzoek en onderwijs naar de Elana techniek' met aanvraagnummer AVD115002017827.

Paragraaf 3.1 van de NTS loopt tekstueel niet helemaal lekker, er lijkt af en toe een woord te ontbreken. Daarnaast is in het project voorstel naar aanleiding van het DEC advies de frase: 'aanraking van de hersenen' vervangen voor 'beschadiging van de hersenen'. Wij willen u vragen dit ook door te voeren in de NTS.

Door de gehele door ons ontvangen NTS zijn woorden en een stuk tekst geel gemarkeerd. Het is niet helemaal duidelijk waarom, maar deze woorden zijn wat onduidelijk voor het algemene publiek en wij willen u verzoeken de geel gemarkeerde tekst begrijpelijker te formuleren of de terminologie een keer uit te leggen.

Onder 3.3 beschrijft u 'de verificatie in [REDACTED] konijnen' kunt u dit herformuleren in voor algemeen publiek begrijpelijke tekst?

Onder 3.6 beschrijft u dat de konijnen 'na afloop worden gedood', wilt u hieraan toevoegen : 'zonder bij te komen uit de narcose' dit is de essentie van een terminaal experiment en zal voor het algemeen publiek meer duidelijkheid verschaffen.

Uw aanvraag wordt op 17 februari door de CCD behandeld, u heeft 14 dagen de tijd om uw aanvraag aan te vullen. De behandeltijd is tot die tijd opgeschort,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

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.

Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.

This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.

Please consider the environment before printing this e-mail.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.I.545.013
2. Titel van het project : Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek
3. Titel van de NTS : Ontwikkeling van de ELANA techniek

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: 21-10-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 02-11-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 07-11-2016/29-11-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: XXX

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 07-11-2016
- Datum antwoord: 29-11-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 2.1 Categorie van het project: Aangezien uw tweede hoofddoel is om meer chirurgen de (bestaande) ELANA techniek te leren, zou ook "Hoger onderwijs of opleiding" aangevinkt moeten worden.
De categorie hoger onderwijs of opleiding is aangevinkt.
- 3.1 Achtergrond: In de eerste alinea staat: "...bij aanraking van de hersenen...". De DEC vermoedt dat u bedoelt om te zeggen: "bij beschadiging van de hersenen". Graag wijzigen.
Aanraking vervangen door beschadiging.
- 3.1 Achtergrond: Pas in de vierde alinea legt u uit wat de ELANA techniek inhoudt. Het zou prettiger leesbaar zijn als deze vierde alinea verplaatst wordt naar de tweede alinea.
Alinea 4 is nu alinea 2 geworden.
- 3.1 Achtergrond: In de vijfde alinea verwijst u naar een filmpje op de website van ELANA. De DEC zou ook graag een plaatje/visuele weergave van de techniek in het projectvoorstel opgenomen zien.
In de extra bijlage is een plaatje weergegeven van de ELANA techniek met een duidelijke Beschrijving.
- 3.1 Achtergrond: U geeft aan dat de 8 hechtingen (deels) vervangen kunnen worden door de ELANA clip techniek. Deze techniek wordt echter maar zeer kort beschreven. De DEC vindt het lastig zich daarbij een voorstelling te maken en verzoekt u dit wat uitvoeriger te beschrijven. Dit betreft immers de kern van de aanvraag.
In de extra bijlage is een plaatje weergegeven van de ELANA techniek met een duidelijke beschrijving.
- 3.1 Achtergrond: U spreekt op veel plaatsen over in vitro onderzoek, waar ex vivo onderzoek bedoeld wordt, zoals onderzoek met slachtmateriaal. Graag correct weergeven.
Dit is aangepast.
- 3.1 Achtergrond: Het is onduidelijk wat verstaan wordt onder lab experimenten. Ex vivo of in vitro experimenten aanduiden als "lab experimenten" is ongebruikelijk en wekt mogelijk misverstanden over de aard van de experimenten. De DEC verzoekt u de term "lab experimenten" niet te gebruiken.
De term 'lab experimenten' verwijderd en in vitro en ex vivo op juiste manier gebruikt.
- 3.2 Doel: Met betrekking tot de haalbaarheid zou hier vermeld kunnen worden dat de onderzoeksgroep die dit project uitvoert de ELANA techniek ook (mede) heeft ontwikkeld.
Dit is aangepast.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De statistiek die u toepast is voor de DEC niet helder. Er is niet aangegeven wat de uitleesparameter en variatie zijn en wat precies met elkaar wordt vergeleken. De DEC verzoekt u deze gegevens toe te voegen of de tekst over de statistische berekening te verwijderen als die niet van toepassing is. Dit geldt ook voor bijlage 1, B. De dieren.

De tekst over de statistische berekening is verwijderd.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft aan dat: "op de [] anastomoses per konijn kunnen worden gemaakt en op de [] anastomoses per konijn". Dat zijn dus [] anastomoses per konijn. Er worden echter [] anastomoses per konijn verricht. Wat is hier de ratio van als theoretisch [] anastomoses mogelijk zijn? Graag nader toelichten.
Er wordt maar op 1 bloedvat per konijn geopereerd, omdat we maar 1 clipje per konijn willen testen.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De laatste alinea over het soort proefdier kan hier verwijderd worden. Dit staat ook al bij B aangegeven, waar het ook hoort te staan.
Dit is verwijderd.
 - D. Vervanging, vermindering en verfijning: De tekst over vervanging kan worden ingekort en worden beperkt tot de kern. Graag wijzigen.
De tekst is ingekort tot de kern.
 - D. Vervanging, vermindering en verfijning: U zou als vermindering nog kunnen opnemen dat er [] anastomoses per konijn worden uitgevoerd.
Dit is toegevoegd aan de aanvraag.
- 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 heeft voldoende samenhang.
Afwijkingen van de bloedvaten in het hoofd komen frequent voor. Clipping en coiling zijn behandelopties die goed toepasbaar zijn voor de oppervlakkig gelegen vaten, maar zijn helaas niet toepasbaar bij de dieper gelegen vaten. Met de conventionele bypass behandeling zijn de dieper gelegen vaten wel te behandelen, maar hierbij moet het vat worden afgesloten, waardoor

onder andere een zuurstoftekort kan ontstaan. De beste methode is om een bypass te maken, zonder dat het bloedvat wordt afgesloten maar waarbij het aneurysma wel kan worden verwijderd. Deze eigenschappen heeft de ELANA techniek. De ELANA techniek is een bypass techniek in het hoofd waarbij het ontvangende vat niet afgesloten hoeft te worden tijdens het maken van de anastomose. Bij deze techniek wordt er een donorvat uit het been gehaald en met 8 hechtingen aan de ELANA ring gemaakt. Deze ring met daaraan het donorvat wordt met 8 hechtingen op het ontvangende vat in het hoofd vastgemaakt. Daarna komt er een laser die door het donorvat wordt geschoven en een gat maakt in het ontvangende vat. Dit wordt gedaan terwijl de bloedstroom niet wordt onderbroken. Deze techniek wordt toegepast op bloedvaten in het hoofd die soms wel 9 cm diep liggen. Nadelen van de techniek zijn dat het uiterst nauwkeurige hechttechniek van de uitvoerder vereist en dat het, vanwege de hechtingen, alleen toepasbaar is bij bloedvaten met een diameter van ■■■■■. Om de techniek breder en eenvoudiger toepasbaar te maken is de ELANA Clip ontwikkeld. Dit is een ring met daaronder 2 pootjes. Deze pootjes worden in het ontvangende vat geschoven en vervangt de 8 zeer moeilijke hechtingen in het hoofd en de huidige ELANA ring.

Met dit onderzoek beoogt men de ELANA techniek (breder) toepasbaar te maken voor patiënten waarvoor nu geen behandelmethode beschikbaar. Het project heeft één bijlage welke is opgedeeld in een onderzoeks- en onderwijsdeel, die gezamenlijk bijdragen aan dit doel: in het onderzoeksdeel wordt de nieuwe Clip techniek getest. Deze techniek kan er toe leiden dat de ELANA techniek ook toegepast kan worden op bloedvaten met verschillende diameters. In het onderwijsdeel wordt aan meer chirurgen de bestaande ELANA techniek geleerd. Chirurgen die de techniek leren geven belangrijke feedback over de bruikbaarheid van de techniek en over mogelijke verbeteringen. Die feedback wordt gebruikt om de bestaande techniek te verbeteren en de nieuwe techniek verder door te ontwikkelen.

De relatie tussen de subdoelen is daarmee helder en vergelijkbaar met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'. Daarom meent de DEC Utrecht dat deze aanvraag een toetsbaar project is.

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 hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om de huidige ELANA techniek te verbeteren en breder toepasbaar te maken door middel van de ELANA Clip techniek en door meer chirurgen de bestaande ELANA techniek te leren. Het uiteindelijke doel van het project is om patiënten met een afwijking in de bloedvaten in de hersenen, waarvoor geen behandelmethode beschikbaar is toch te kunnen behandelen. Voordat een dergelijke (gewijzigde) behandelmethode in mensen toegepast kan worden is het van belang dat in dierexperimenten aannemelijk is gemaakt dat de

techniek veilig is en goed werkt.. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de (toekomstige) patiënten, de proefdieren, de onderzoekers en het bedrijf ELANA.

De eerste belanghebbenden zijn (potentiele) patiënten. Zoals reeds genoemd bij C1, komen afwijkingen van de bloedvaten in het hoofd komen frequent voor en is momenteel niet voor alle patiënten een behandeling mogelijk. Door de toepasbaarheid van de ELANA techniek te vergroten, door verbetering van de techniek en doordat meer chirurgen de techniek beheersen, kunnen meer (toekomstige) patiënten (beter) geholpen worden en wordt hun leven wellicht gered.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en als gevolg van het experiment zullen de dieren stress ondervinden. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het ontwikkelen van deze nieuwe techniek bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Voor het bedrijf ELANA geldt dat het verbeteren van de techniek, waardoor de toepasbaarheid vergroot wordt, ervoor kan zorgen dat de techniek breder geëxploiteerd kan worden. Wetenschappelijke reputatie en commercieel gewin kunnen door de onderzoeker c.q. ELANA van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC Utrecht geen rol te spelen in de ethische afweging over 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. Dit project wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep die zelf ook de ELANA techniek (mede) heeft ontwikkeld. De DEC Utrecht is er daarom van 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. Het project heeft een heldere strategie, weergegeven in één bijlage. Voorafgaand aan het project zullen met in vitro en ex vivo experimenten de drie losse stappen van de ELANA Clip techniek (de Clip, de Laser Catheter en een manier om de clip en de catheter tijdelijk aan elkaar

te bevestigen) uitvoerig worden onderzocht. Vervolgens worden deze drie stappen samengevoegd, om de samenhang te testen. Om te zien of het clip techniek goed blijft functioneren als er daadwerkelijk bloed door de vaten stroomt zijn de in het voorliggende project beschreven in vivo experimenten noodzakelijk. Er zijn [REDACTED] devices ontwikkeld met verschillende diameter ranges: [REDACTED] bloedvaten. Het onderzoek zal beginnen met het device met de maatvoering [REDACTED] omdat deze aansluit op de maatvoering van de al bestaande ELANA ring techniek. Een andere methode om de ELANA techniek breder toepasbaar te maken, is door meer chirurgen op te leiden. Chirurgen zullen starten met een ex vivo training in het lab om de techniek uitvoerig te trainen en meerdere bypasses te maken. Zodra de cursist bekwaam is in de techniek zal worden geoefend op een levend dier. De chirurgen in deze trainingen geven vaak belangrijke input over de ideale gebruikswijze van de techniek, wat gezien wordt als belangrijke feedback. Op deze manier is ook het idee van de ELANA clip ontstaan.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Mits de dieren niet vooraf reeds geopereerd of vasculair onderzocht zijn, is er sprake van hergebruik van dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Alleen bij eventueel vechten van de dieren of bij het laatste konijn uit de kooi kan sprake zijn van solitaire huisvesting. Dit zal alleen in het uiterste geval plaatsvinden en van zo'n kort mogelijke duur zijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd als terminaal, omdat de dieren niet bijkomen uit de anesthesie. Alleen in het geval er toch solitaire huisvesting nodig is, dan zal dit licht ongerief met zich meebrengen.

12. De integriteit van de dieren wordt in fysiek opzicht in zeer beperkte mate aangetast vanwege het onder anesthesie brengen van de dieren en het aansluitend doden van de dieren (terminaal experiment). Mochten de dieren in het uiterste geval toch solitair gehuisvest worden, dan wordt de integriteit van de dieren ook gedragsmatig aangetast, omdat de dieren dan de mogelijkheid ontnomen wordt om op bepaalde aspecten van hun natuurlijke gedrag uit te oefenen.
13. Omdat het een terminale studie betreft zijn er terecht geen humane eindpunten gedefinieerd.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand aan het experiment wordt de ELANA Clip techniek uitvoerig getest met ex vivo experimenten. Voor deze experimenten worden konijnenvaten gebruikt die verkregen zijn bij een consumptieslachterij. Op die manier wordt voorkomen dat er speciaal voor dit onderzoek dieren gedood moeten worden.
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. Voor zowel het onderzoek als het onderwijs zullen per dier ■ anastomoses gemaakt worden, waardoor het aantal benodigde dieren aanzienlijk vermindert.
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. Er is voor het konijn als diermodel gekozen omdat de diameter van de ■ en de eigenschappen (wanddikte, structuur) zeer goed overeenkomen met de bloedvaten met een grote diameter in het menselijke brein. Hetzelfde geldt voor de halsslagader en de dijbeenslagader/heupslagader van een konijn versus de bloedvaten in het menselijk brein met een kleine diameter.
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, omdat het ontvangende bloedvat met de daarop gemaakte anastomoses wordt verwijderd en vervolgens uitvoerig geanalyseerd in het lab. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel konijnen 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 het verbeteren en breder toepasbaar maken van de ELANA techniek middels onderzoek en onderwijs, teneinde een groter aantal patiënten te kunnen behandelen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een geringe aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met terminaal ongerief. Daar staat tegenover dat er van dit onderzoek belangrijke nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen verwacht mogen worden en dat chirurgen worden getraind in het verrichten van een complexe, levensreddende techniek. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Op korte termijn kunnen deze nieuwe ontwikkelingen van substantieel belang zijn voor mensen met een afwijking aan de bloedvaten in het hoofd, waarvoor geen behandelmethodede beschikbaar is, anders dan de conventionele bypass methode met mogelijk ernstige consequenties. De DEC kent ook daar veel gewicht aan toe.
Afwijkingen aan de bloedvaten in het hoofd is een veel voorkomende aandoening die kan leiden tot gezondheidsklachten en een fatale bloeding in de hersenen. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC Utrecht daar weinig gewicht aan toe. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project bijdragen aan het optimaliseren en breder inzetbaarheid maken van de ELANA techniek. Mensen die lijden aan een bloedvatafwijking in de hersenen waarvoor geen behandeling beschikbaar is, zijn er bij gebaat wanneer met behulp van deze techniekoptimalisatie en kennisoverdracht, nieuwe devices ontwikkeld en chirurgen getraind kunnen worden. Het is aannemelijk dat de translationele doelstellingen en onderwijsdoelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC Utrecht van oordeel dat het optimaliseren en breder inzetbaar maken van de ELANA techniek een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

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

AVD115002017827

Bijlagen

1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek" met aanvraagnummer AVD115002017827. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de NTS op een aantal punten te herzien. U heeft de wijzigingen doorgevoerd en een nieuwe NTS aan ons toegestuurd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project "Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek" starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 februari 2017 tot en met 1 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 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.

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:
AVD115002017827

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 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 21 februari 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de Elana techniek" met aanvraagnummer AVD115002017827, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Neurochirurg. Voor de uitvoering van het project is Research & Laboratory Manager verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 januari 2017, ontvangen op 17 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Onderzoek en onderwijs naar de verbetering van de ELANA techniek				
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / new zealand white 3 kilo bij aanvang	85	100% Terminal	



Aanvraagnummer:

AVD115002017827

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:

AVD115002017827

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017828	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS initieel			x						
3	NTS aangepast	x								
4	Projectvoorstel				x		x	x		
5	Bijlage animal procedure 1			x						
6	Bijlage animal procedure 2 initieel			x						
7	Bijlage animal procedure 2 aangepast			x						
8	Bijlage animal procedure 3				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Mail aanvullende informatie				x		x	x		
11	DEC advies				x		x	x		
12	Advies CCD		x						x	
13	Beschikking en vergunning				x		x	x		



23 JAN 2017

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	11200
		<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	Vrije Universiteit te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	53815211
		Straat en huisnummer	de Boelelaan 1105
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>	Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01-03-2017
	Einddatum	28-02-2022
3.2 Wat is de titel van het project?	De pontine kernen in het controleren van bewegingen	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De Pontine kernen in het controleren van bewegingen	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
	Postadres	Amsterdam Nederland
	E-mailadres	

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 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 *
 Inkoopordernummer: [REDACTED]
 Factuuradres:
 [REDACTED]
 [REDACTED] Amsterdam

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

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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Amsterdam

Datum 18-01-2017

Handtekening [REDACTED]



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | De Pontine kernen in het controleren van bewegingen
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Hersenwetenschappen, fundamenteel, muizen, bewegingsstoornissen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Bewuste bewegingen zijn een essentieel onderdeel van het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Deze aandoeningen hebben een relatief hoge incidentie. Alleen al de cerebellaire ataxia's, waarbij bewegingen ongecoördineerd zijn, hebben een incidentie rond de 5 op 100.000, wat betekent dat er alleen al in Nederland ongeveer 1.000 patiënten zijn met ataxie. Een andere veel voorkomende bewegingsaandoening, dystonie, waarbij spiercontracties onwillekeurig en ongecontroleerd zijn, komt bij ongeveer 12.000 patiënten in Nederland voor. Bewegingsstoornissen zijn ook vaak aanwezig in combinatie met andere verschijnselen, zoals bijvoorbeeld bij Huntington's (~2.000 patiënten in Nederland). Het gaat hier dus om een grote patiëntengroep waarvoor behandelmethode niet of zeer beperkt aanwezig zijn. Om deze ziektes te behandelen moeten we eerst de

onderliggende oorzaken vinden. Om dit te bereiken moeten we een uitgebreide karakterisatie doen van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen.

Binnen dit project zullen we kijken naar de communicatie tussen de grote en de kleine hersenen. Beide zijn intensief betrokken bij bewuste bewegingen: vanuit de grote hersenen komen de commando's om te bewegen terwijl de kleinen hersenen betrokken zijn bij de verfijning van bewegingen. Hoe deze twee gebieden samenwerken om bewegingen aan te sturen is vrijwel volledig onbekend. Het project heeft tot doel de communicatie tussen de grote en kleine hersenen te onderzoeken.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project is vooral fundamenteel wetenschappelijk van karakter. Het doel van het onderzoek is dan ook in de eerste plaats het vergroten van onze kennis van de aansturing van bewegingen. Op langere termijn zal dit onderzoek kunnen bijdragen aan de behandeling van aandoeningen op het gebied van beweging.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen, 400 dieren

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Alle muizen zullen een operatie moeten ondergaan wat leidt tot matig ongerief. Een deel van de dieren zal ook gedurende de tijd van de proef geen vrije toegang tot water hebben om gedrag tijdens het onderzoek te sturen. Dit zou kunnen leiden tot een onaangenaam gevoel van dorst bij de proefdieren. Verder wordt een deel van dieren met het hoofd vastgezet in een proefopstelling. Dit zogenaamde fixeren van het dier geeft vooral in de eerste twee sessies extra stress.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig ongerief: 400

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden tijdens of na de proeven gedood om de hersenen buiten het lichaam te kunnen bestuderen.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Er is op het moment geen vervanging voor deze proeven. Om onderzoek te doen aan de basale principes van gedrag of van de hersenen zullen dieren gebruikt moeten worden. Het is namelijk niet mogelijk om de verbindingen tussen hersendelen te onderzoeken zonder dieren te gebruiken aangezien er geen kennis bestaat om deze verbindingen in vitro na te bootsen.

4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden

Het aantal dieren is geminimaliseerd door gebruik te maken van een geoptimaliseerde proefopstellingen en door gebruik te maken van de

verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

nieuwste technieken.

4.3 **Verfijning**

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

Het doel van het onderzoek is meer inzicht verkrijgen in de aansturing van bewegingen van zoogdieren en zo in de toekomst betere behandelmethoden voor bewegingsziekten te kunnen ontwikkelen. Hierdoor is de bestudering van het zenuwstelsel van 'simpelere' dieren zoals fruitvliegen en slakken niet geschikt. Aangezien we met dit onderzoek fundamentele aspecten van de aansturing van bewegingen in zoogdieren, als model voor de mens, willen onderzoeken hebben we gekozen voor een van de meest gebruikte (en dus waar veel ervaring mee is) model dieren, namelijk de muis. De hersenen van de muis lijken sterk op die van primaten zoals de mens, hierdoor zijn resultaten van dit onderzoek gemakkelijk te vertalen naar toepasbaarheid in de mens.

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

Iedere operatie zal worden uitgevoerd door getrainde wetenschappers. Alle dieren worden onder diepe anesthesie gebracht voor aanvang van operaties en rondom de operatie wordt pijnstilling gegeven aan de dieren om het ongerief zo laag mogelijk te houden. Dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd. Ook zijn er humane eindpunten gedefinieerd om onnodig lijden te voorkomen, dit zal slechts zeer zelden nodig zijn (<5%).

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1 Vul uw
- .1 deelnemernummer van de
- 1 Vul de naam van de
- .2 instelling of organisatie in.
- 1 Vul de titel van het
- .3 project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Bewuste bewegingen zijn een essentieel voor het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij

bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Deze aandoeningen hebben een relatief hoge incidentie. Alleen al de cerebellaire ataxia's, waarbij bewegingen ongecoördineerd zijn, hebben een incidentie rond de 5 op 100.000, wat betekent dat er alleen al in Nederland ongeveer 1.000 patiënten zijn met ataxie. Een andere veel voorkomende bewegingsaandoening, dystonie, waarbij spiercontracties onwillekeurig en ongecontroleerd zijn, komt bij ongeveer 12.000 patiënten in Nederland voor. Bewegingsstoornissen zijn ook vaak aanwezig in combinatie met andere verschijnselen, zoals bijvoorbeeld bij Huntington's (~2.000 patiënten in Nederland). Het gaat hier dus om een grote patiëntengroep waarvoor behandelmethode niet of zeer beperkt aanwezig zijn.

Om deze ziektes in de toekomst te behandelen dienen we eerst de onderliggende oorzaken vinden. Om dit te bereiken moeten we een uitgebreide karakterisatie doen van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden onderzoeken die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen.

Motor commando's worden gegenereerd in de motor schors van de grote hersenen waarna deze commando's naar hersenkernen in de hersenstam gestuurd worden. De kleine hersenen (cerebellum) verfijnen bewegingen door de activiteit in deze hersenstamkernen te reguleren. Ze doen dit door sensorische informatie uit het gehele brein en het lichaam te combineren met het motor commando gegenereerd in de grote hersenen. De algemeen geldende hypothese is dat een hersenstructuur, de pontine kernen welke gesitueerd zijn tussen de grote en kleine hersenen, dit motor commando doorgeven van de grote naar de kleine hersenen. Maar het bewijs dat de pontine kernen dit motor commando slechts doorgeven zonder verdere bewerkingen hierop uit te voeren is erg zwak.

In feite weten we niets over deze voorste pontine kernen: De inputs, mogelijke informatieverwerking, en convergentie van verschillende inputs is allemaal onbekend. Dit gat in onze kennis belemmert ons een compleet overzicht en begrip te hebben van de aansturing van bewegingen, en belemmert ons vermogen ziektes van het bewegingsapparaat te behandelen.

In dit voorgestelde onderzoek willen de wetenschappers onderzoeken welke gebieden in de hersenen input geven naar de voorste pontine kernen, hoe deze informatie wordt verwerkt en gecombineerd en welke rol de voorste pontine kernen precies spelen in beweging. Dit doen we door een combinatie van anatomisch, elektrofysiologisch en gedragsmatig onderzoek in muizen. De betrokken hersenstructuren zijn goed vergelijkbaar tussen mens en muis, en de gedragstaak in muizen is direct te vergelijken met overeenkomstige bewegingen bij de mens.

[REDACTED]. De wetenschappelijke aspecten van dit onderzoek zijn beoordeeld en excellent bevonden door voorselectie, peer-review en een commissie van wetenschappers. [REDACTED]

[REDACTED]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit onderzoek richt zich er op om inzicht te verkrijgen in de basale werking van de pontine kernen. Specifiek zal de hypothese worden onderzocht dat de pontine kernen informatie integreren en verwerken van verschillende bronnen, en daarom niet alleen maar een doorgeefluik zijn, maar een essentieel onderdeel van het systeem dat bewuste bewegingen aanstuurt. Deze hypothese zal onderzocht worden via drie subdoelen:

1. Het identificeren van hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau
2. Onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronen in de pontine kernen.

3. Vaststellen wat en hoe de pontine bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen verzorgt.

Voor dit onderzoek is er financiering beschikbaar voor de komende vijf jaren. Het afronden van het gehele onderzoek wordt dan ook in deze tijdsspanne geschat. De hoofdonderzoeker op de aanvraag heeft meer dan tien jaar ervaring op het gebied van anatomie, fysiologie en gedrag. Bovendien heeft de afdeling waar het onderzoek gedaan wordt ruime expertise op al deze gebieden. Dit komt onder andere tot uitdrukking in het groot aantal opgeleide PhD studenten en publicaties in toonaangevende wetenschappelijke tijdschriften zoals Neuron, Nature Communications, Nature Neuroscience en eLife. Daarnaast heeft de hoofdaanvrager van dit protocol internationale en nationale samenwerkingen op het gebied van elektrofysiologie en gedrag. Hierdoor zijn de subdoelen haalbaar binnen vijf jaar.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

De pontine kernen zijn de grootste bron van input naar de kleine hersenen. In de kleine hersenen komt sensorische informatie binnen vanaf de periferie van het zenuwstelsel, en wordt daar gecombineerd met input vanaf de voorste pontine kernen welke meer dan de helft van alle input naar de kleine hersenen bevat. Maar, er is zeer weinig tot niets bekend over de voorste pontine kernen. Slechts een handvol publicaties beschrijft enkele elektrofysiologische eigenschappen van neuronen in de pontine kernen. Gedetailleerde, cel-specifieke onderzoeken ontbreken helemaal (subdoel 1) en het is onbekend of en hoe informatie van verschillende bronnen wordt gecombineerd (subdoel 2). Tenslotte is het onbekend wat de pontine kernen precies bijdragen aan het systeem voor het controleren van bewuste bewegingen (subdoel 3). Deze zaken zijn noodzakelijk voor ons begrip van de pontine kernen, en onmisbaar om te begrijpen hoe de hersenen bewegingen aansturen.

Maatschappelijk belang

Als we ooit bewegingsziektes doeltreffend willen behandelen, dan is het van belang alle aspecten van de aansturing van beweging te begrijpen. Ziektes die effect hebben op de aansturing van de beweging hebben een relatief hoge incidentie. In Nederland zijn er ongeveer 15.000 patiënten met aandoeningen aan de controlering van bewuste bewegingen waar geen therapie voor beschikbaar is. Bovendien worden deze ziektes gekenmerkt door een lage kwaliteit van leven en hoge kosten voor de maatschappij (López-Bastida *et al.*, 2008). Als we de onderliggende oorzaken van deze ziektes beter begrijpen, dan wordt het mogelijk behandelingen te formuleren en uiteindelijk de kwaliteit van leven van patiënten te verbeteren van patiënten.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het onderzoek is opgebouwd uit drie onderdelen:

1. Het identificeren van hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau.

Met anatomisch onderzoek zullen we identificeren welke gebieden van de hersenen input geven naar de voorste pontine kernen. Hiervoor gebruiken we een combinatie van transgene muizen en tracing (aankleuren van projecties) met (aangepaste) virussen.

2. Onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronen in de pontine kernen.

Uitkomsten van doel 1 zullen gebruikt worden om gericht elektrofysiologisch onderzoek te

doen naar de verbindingen (synapsen) gevormd op neuronen in de voorste pontine kernen. Ook zullen we tijdens dit onderdeel onderzoeken hoe verschillende inputs samenkomen in een pontine kern neuron. Hiervoor gebruiken we virussen die een eiwit tot expressie brengen in neuronen waarmee we deze neuronen kunnen stimuleren met licht (optogenetica, Yizhar *et al.*, 2011) We kunnen beginnen met het werk aan doel 2 voordat alle studies naar doel 1 zijn afgerond. Zodra er resultaten zijn behaald waarbij we gebieden hebben geïdentificeerd die projecteren naar de pontine kernen, kunnen we beginnen met functionele onderzoeken.

3. Vaststellen wat en hoe de pontine kernen bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen verzorgt.

Om direct de rol van de voorste pontine kernen in gedrag te testen zullen muizen getraind worden op een gedragstaak. De muis moet op een knop drukken en die weer loslaten om een beloning te verkrijgen.

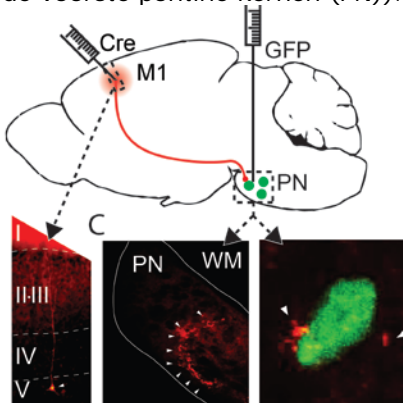
Muizen ondergaan een operatie waarbij virus wordt geïnjecteerd, of waarbij elektrodes worden geïmplanteerd. Na een herstelperiode van enkele dagen tot enkele weken zullen de muizen de taak uitvoeren en zullen de voorste pontine kernen op specifieke momenten (met milliseconde precisie) worden uitgeschakeld, of er zullen opnames gemaakt worden van hersenactiviteit via de geïmplanteerde elektrodes. De combinatie van het opnemen van de neuronale activiteit en het moduleren van die activiteit tijdens gedrag zijn krachtige gereedschappen om de werking van een zenuwverbinding aan te tonen.

Muizen hebben een zenuwstelsel dat heel goed te vergelijken is met dat van de mens. Bovendien kunnen we in muizen belangrijke gedragingen onderzoeken die vergelijkbaar zijn met die wij als mensen maken (b.v. een reikbeweging om iets te pakken). Verder zijn er verschillende technieken beschikbaar die wij alleen in muizen kunnen toepassen, zoals bepaalde transgenen of virus injecties. In dit voorgestelde onderzoek gebruiken we een combinatie van anatomie, elektrofysiologie en gedragsonderzoek. Deze drie aanpakken geven complementaire inzichten in hoe de voorste pontine kernen werken. Anatomie zal gedaan worden met een transgene muis waarmee verbindingen in de hersenen gevisualiseerd kunnen worden. Complementair hieraan zal van geïdentificeerde verbindingen de functie onderzocht worden met behulp van elektrofysiologie. Uiteindelijk zal het algehele belang van de verwerking van signalen in de pontine kernen onderzocht worden met een gedragstaak.

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

1. Anatomie

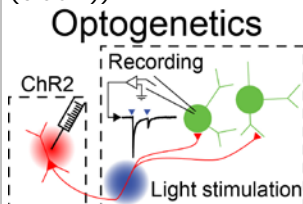
Voor dit subdoel ondergaan de muizen een operatie waarbij onder diepe anesthesie enkele gaten in de schedel geboord zullen worden en virus geïnjecteerd zal worden. Na een periode van enkele dagen tot weken zal het dier worden gedood en worden de hersenen onderzocht voor anatomische doeleinden (Zie figuur hieronder voor een voorbeeld van injectie (Cre) in motor cortex (M1) en synapsen op neuronen in de voorste pontine kernen (PN)).



2. Electrofysiologie

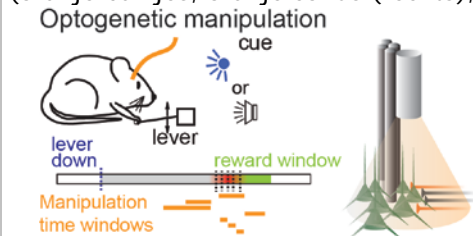
Voor dit onderdeel ondergaan muizen eerst een operatie waarbij virus zal worden geïnjecteerd in de

hersenen. Met dit virus kunnen we in plakjes van de hersenen specifieke zenuwbanen stimuleren (Yizhar *et al.*, 2011). De muizen zullen enkele dagen tot weken overleven waarna ze zullen worden gedood en de hersenen zullen worden onderzocht met elektrofyysiologie (Zie de figuur hieronder voor een schema van het experiment. Virus met een eiwit voor stimulatie met licht (ChR2) wordt geïnjecteerd in neuronen (rood, links). Verbindingen naar andere neuronen (groen) kunnen gestimuleerd worden met licht (blauw)).



3. Gedrag

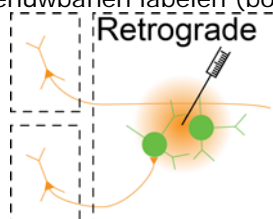
Voor dit onderdeel ondergaan de muizen een operatie waarbij of virus geïnjecteerd zal worden, of elektrodes worden geïmplanteerd. Ook wordt er een bevestigingspunt op de schedel geplaatst om de muis in de experimentele opstelling vast te kunnen zetten met het hoofd. Dit vastzetten van het hoofd is nodig voor het uitvoeren en meten van de gedragstaak. Na een herstelperiode van enkele dagen tot weken zullen de dieren gedragsmatige training ondergaan om de gedragstaak te leren. Voor dit leren is het noodzakelijk dat de dieren voldoende gemotiveerd zijn om de taak uit te voeren. Hiervoor gebruiken we de veelgebruikte aanpak van water restrictie. Muizen zullen gedurende de dag-nacht cyclus geen vrije beschikking hebben over water, maar hun water inname moeten verdienen via het uitvoeren van de gedragstaak. Eventueel tekort zal (gedeeltelijk) aangevuld worden nadat de dieren iedere dag uit de opstelling worden gehaald (Zie de figuur hieronder voor een schematisch overzicht van het gedrag. De muis drukt op een knop (lever) in respons op een licht of geluid (cue). De muis drukt de knop in (lever down) en krijgt dan na een bepaalde tijd het signaal voor loslaten, waarna de muis een waterbeloning krijgt (reward window). Tijdens dit gedrag kunnen we neuronen in de pontine kernen manipuleren (oranje balkjes, oranje conus (rechts), of opnemen via elektrodes (rechts).)



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.

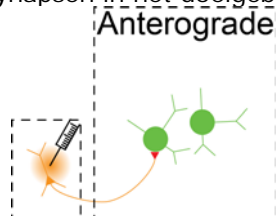
1. Anatomie

Als eerste zal onderzocht worden welke gebieden input geven aan de pontine kernen. Eerst zal er algemeen inzicht verkregen worden over de aanvoerende gebieden door zogenaamde retrograde tracers. Deze techniek werkt goed om een eerste inzicht te krijgen over aanvoerende gebieden, maar is niet geschikt om definitief uitsluitsel te geven over synaptische contacten (Zie ook de figuur hieronder die laat zien dat retrograde tracer injecties (rechts) zowel echte contacten (onder, oranje) als passerende zenuwbanen labelen (boven, oranje)).



Vervolgens zullen we gebruik maken van zogenaamde anterograde tracers. Dit is een essentiële stap aangezien uitkomst van dit onderdeel bepaalt waar precies de volgende injecties gedaan worden om de synapsen in de pontine kernen te onderzoeken. Het is echter niet nodig om alle anatomie af te ronden

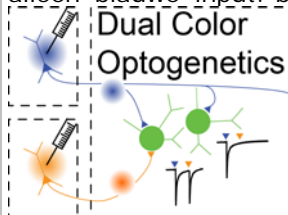
voor er begonnen kan worden met de elektrofysiologische onderzoeken. Zodra er gebieden in de hersenen geïdentificeerd zijn die input geven aan de pontine kernen kan er begonnen worden met elektrofysiologie (Zie ook de figuur hieronder die dezelfde verbindingen laat zien als met de retrograde tracers, maar alleen de echte verbinding (onder) zal resulteren in het aankleuren van vezelbanen en synapsen in het doelgebied (oranje neuron, rode synaps)).



Alleen gebieden waarbij we echte synaptische contacten hebben geïdentificeerd (zoals hierboven bij de anterograde tracers) zullen verder worden geanalyseerd met elektrofysiologie (Zie ook schema onderaan).

2. Electrofysiologie

De invloed van de verschillende gebieden die projecteren naar de pontine kernen zal onderzocht worden in hersenplakjes van muizen. Eerst zullen we gebieden die input geven aan de pontine kernen injecteren met een virus dat het mogelijk maakt hersencellen te stimuleren met licht (Yizhar *et al.*, 2011). Na enkele weken kunnen experimenten worden uitgevoerd op het weefsel van deze muizen om te bepalen wat de eigenschappen zijn van de synaptische input. In dit verband zullen we vooral kijken naar de grootte van de synaptische input en de korte-termijn plasticiteit. Er zal ook specifiek gekeken worden naar hoe verschillende inputs samen de neuronen in de pontine kernen beïnvloeden. Dit zal gedaan worden op basis van eerdere anatomische onderzoeken. Als er aanwijzingen zijn vanuit onze anatomische onderzoeken dat bepaalde hersengebieden overlappende projecties sturen naar de pontine kernen, dan zullen wij deze potentiële overlap functioneel onderzoeken. Er zal in dit geval op twee plaatsen virus geïnjecteerd worden om twee verschillende inputs te kunnen stimuleren met twee verschillende golflengtes licht (Zie hieronder voor een schematisch voorbeeld. Om stimulatie met blauw licht mogelijk te maken zal er virus worden geïnjecteerd in een aanvoerend gebied (boven, blauw). Stimulatie met oranje licht zal mogelijk gemaakt worden door injectie van een ander virus (onder, oranje). Door te stimuleren met twee verschillende kleuren licht (blauw en oranje, rechts) en tegelijkertijd opnames te maken van de activiteit van neuronen in hersenplakjes (rechts), kunnen we evalueren of beide inputs binnenkomen op een neuron (vergelijk de twee traces aan de rechterkant, alleen 'blauwe' input: boven, combinatie van input: onder)).



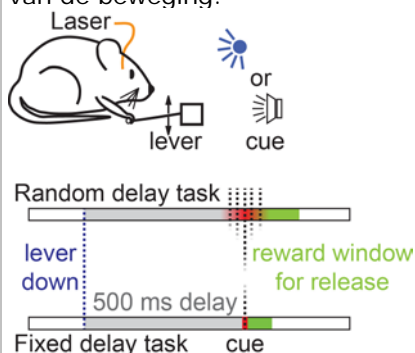
Dit deel van de experimenten geeft ons inzicht in hoe signalen van verschillende hersengebieden worden getransformeerd en gecombineerd door de synapsen in de pontine kernen. Hiermee kunnen we voorspellen hoe de neuronen in de pontine kernen signalen veranderen die ze binnenkrijgen van andere gebieden. Deze voorspelling zullen we vervolgens testen met het derde blok experimenten.

3. Gedrag

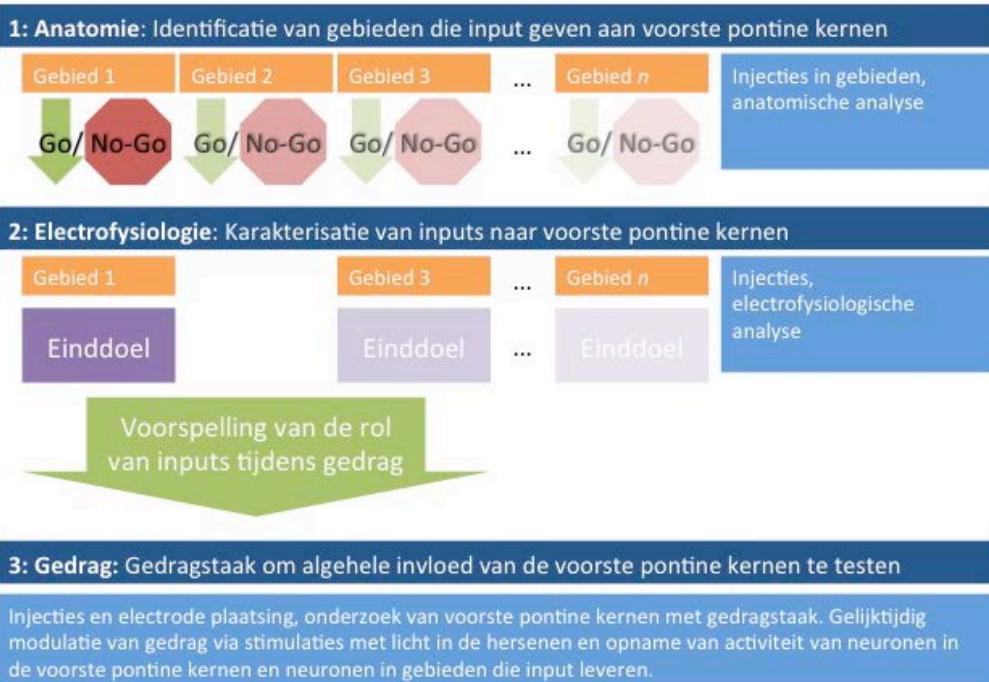
De functie van de pontine kernen tijdens gedrag zal onderzocht worden door tijdens de uitvoering van een beweging en tijdens het leren van een beweging de pontine kernen kortstondig uit te schakelen. Dit kan worden gedaan door virus te injecteren in de pontine kernen waarmee we met licht neuronen kunnen uitschakelen. Door tijdens gedrag korte lichtpulsjes te geven wordt zo de output van de pontine kernen geblokkeerd.

De muis wordt getraind een knop in te drukken en ingedrukt te houden tot het een signaal krijgt de knop los te laten. Van deze gedragstaak gebruiken we twee varianten: variabele en vaste timing tussen indrukken en signaal tot loslaten (zie figuur hieronder, variable timing: Random

delay task; vaste timing: Fixed delay task). Met de eerste variant kunnen we de directe invloed van de pontine kernen op beweging onderzoeken. Immers, het teken voor de muis om los te laten wordt door de onderzoeker gegeven en is niet te voorspellen door het dier, en we kunnen dus net voor, tijdens of net na het 'loslaat signaal' kort de pontine kernen uitschakelen en zo de invloed van de pontine kernen op bewegingen onderzoeken. De tweede variant van het taakje zal zijn dat de tijd tussen indrukken en het signaal tot loslaten vast ligt. Hierdoor kan de muis voorspellen wanneer het signaal tot loslaten komt, en zal dus leren de knop precies los te laten op het moment van het signaal (dit maximaliseert immers de beloning voor de muis, zie onder). Zodra de muis dit geleerd heeft zullen we de timing veranderen waardoor de muis langer of korter de knop ingedrukt moet houden. Dit is dus een leertaak, en we kunnen tijdens deze variant onderzoeken wat de rol van de pontine kernen is voor het leren van bewegingen door de pontine kernen kortstondig uit te schakelen tijdens het leren van de nieuwe timing van de beweging.



Tijdens dit gedrag kunnen we ook de neuronale activiteit in de voorste pontine kernen en in afferente structuren meten. Door onze eerdere onderzoeken in de anatomie kunnen we verschillende hersengebieden doelgericht bekijken en het vuurgedrag van de neuronen vergelijken met de voorste pontine kernen. Ook kunnen we een vergelijking maken met de fysiologie in plakjes. Immers, tijdens deze experimenten hebben we een directe voorspelling kunnen maken hoe de pontine kernen signalen veranderen. Deze voorspelling zullen we direct testen door tijdens gedrag activiteit te meten in afferente hersengebieden en de pontine kernen zelf. Door het voorpatroon van bijvoorbeeld de motor cortex te vergelijken met het voorpatroon van de pontine kernen, kunnen we bepalen hoe de pontine kernen het signaal van de motor cortex veranderen voor het door te geven aan de kleine hersenen.



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Anatomische studies
2	Studies electrofysiologie
3	Studies met gedrag
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.	11200	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	Anatomie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is een overzicht van projecties naar de pontine kernen en de overlap van verschillende projecties. Hiervoor zijn verschillende technieken mogelijk, maar alleen de aanpak met virusinjecties geeft de mogelijkheid om zowel de projectie als de synapsen te detecteren. Conventionele tracers zullen worden gebruikt om retrograad te traceren (d.w.z. vanaf het doelgebied terug naar de aanvoerende gebieden.) Eerst zal er onderzoek gedaan worden met retrograde tracers in een beperkt aantal dieren om eventuele inputs naar de voorste pontine kernen te identificeren. Daarna zal er anterograde tracing (d.w.z. vanaf het aanvoerende- naar het doelgebied toe) gedaan worden.

Met tracers kunnen alleen de vezelbanen aangekleurd worden, en is er geen uitsluitel te geven over daadwerkelijke contacten tussen neuronen. Door gebruik te maken van transgene muizen kunnen we naast de vezelbanen ook synaptische contacten detecteren. Deze aanpak is niet mogelijk in andere diersoorten en levert een belangrijke bijdrage aan de waarde van de data van de proef.

Op basis van literatuur verwachten wij dat verschillende gebieden in de hersenen projecties naar dezelfde subgebieden, of zelfs naar dezelfde neuronen, in de pontine kernen sturen. Om hier inzicht in te verkrijgen maken we gebruik van verschillende virus injecties in transgene dieren. Per muis zullen er twee injecties gedaan worden, één in ieder van de te onderzoeken gebieden. Deze injecties kleuren de twee verschillende pathways aan met een verschillende kleur, en ze zorgen er voor, in combinatie met het transgen in de muis, dat de synapsen in deze pathways ook kunnen worden onderzocht. Deze twee injecties gebeuren direct na elkaar tijdens één operatie.

Muizen zullen worden geïnjecteerd met virus of een conventionele tracer om input naar de pontine kernen te onderzoeken. Muizen zullen na injectie enkele dagen tot weken overleven waarna ze onder diepe anesthesie zullen worden geperfuseerd. Hierna zullen er hersenplakjes worden gemaakt voor anatomische onderzoeken.

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteerd in de hersenen met virus of een conventionele tracer. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

De muis zal worden geanestheiseerd en in een stereotact geplaatst worden, ear bars zullen worden ingesmeerd met pijnstillende crème. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gat en zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt.

In de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden. Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geperfuseerd voor anatomische onderzoeken. Na fixatie worden de hersenen uitgediepteerd en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor observatie en analyse onder de microscoop.

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

Schattingen voor het aantal dieren zijn gebaseerd op referentie injecties weergegeven op de Allen Brain Atlas (Mouse connectivity: <http://connectivity.brain-map.org>). (Voor details, zie uitleg per proef) Verder is er zeer beperkt tot geen andere literatuur beschikbaar. Bovendien gaat het hier om kwalitatieve proeven en zijn de uitkomsten van de proeven niet uit te drukken in statistische significanties.

B. De dieren

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

In totaal zijn drie proeven nodig: retrograde tracing om gebieden te identificeren die input geven, anterograde tracing om te bevestigen dat geïdentificeerde gebieden daadwerkelijk inputs geven, en dubbele anterograde tracing om het samenkomen van informatie te kunnen detecteren.

Retrograad

Muis: Wild type, eigen fok (indien beschikbaar) of gekocht. Zowel vrouwtjes als mannetjes zullen worden gebruikt.

Injectie dag postnataal 20 tot 30 (p20-p30), perfusie vanaf p30. We willen de projecties naar de pontine kernen in beeld brengen in (jong) volwassen dieren. Voor een goed vergelijk met onze fysiologische experimenten (dierproeven 2 & 3) is een startpunt van 30 dagen goed.

Initieel: twintig dieren voor retrograde injecties met retrobeads. Retrograde injecties geven snel een volledig overzicht van mogelijke inputs. Injecties zullen moeten worden geplaatst in de grijze stof van de pontine kernen, een relatief klein gebied in de hersenen. Hierdoor is de verwachting dat enkele injecties niet goed geplaatst zullen zijn. We verwachten een uitval van 50% voor deze injectie omdat het geïnfecteerde gebied klein moet zijn, goed geplaatst, maar wel groot genoeg moet zijn om het grootste deel van de pontine kernen te raken. Deze schatting van de grootte van het doelgebied, gecombineerd met de vorm van het doelgebied en het belang van exclusie van omliggende is tot stand gekomen met behulp van de Allen Brain Atlas. Met vijf geslaagde injecties hebben we genoeg data om de retrograde tracing kwalitatief te kunnen beoordelen. Maar we willen tegelijkertijd genoeg dieren hebben voor deze proef, dus initieel vragen we 20 dieren aan, maar voegen een go/ no-go moment toe waarbij we alleen dieren gebruiken tot we vijf geslaagde injecties hebben. Dus in totaal maximaal **20 dieren**.

Anterograad enkele injecties

Muis: Transgeen Synaptophysin-tdTomato, Eigen fok. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Injectie: p20-30, perfusie vanaf p35. Het virus moet enkele dagen tot weken tot expressie komen in de hersenen, dus vanaf 35 dagen oud (voor dieren geïnjecteerd op p20) kunnen we dieren gebruiken.

Per gebied geïdentificeerd met retrograde injecties zullen we anterograde tracing doen. Dit is belangrijk aangezien retrograde injecties een risico hebben vezels te labelen die slechts passerend zijn, maar geen

contact maken (zie projectvoorstel). Om deze confounding factor te voorkomen moeten we ook anterograde tracing doen. Verder kijken we direct naar synaptische contacten door synapsen aan te kleuren. Hiervoor gebruiken we een transgene muizenlijn waarbij de synaptische contacten fluorescent gelabeld zijn.

Op basis van literatuur en de mouse connectivity atlas (zie bovenstaand) verwachten we inputs vanaf vrijwel de gehele sensorische en motorische schors. Verder verwachten we input vanuit enkele gebieden in de kleine hersenen en waarschijnlijk kleine projecties vanuit de non motor of sensorische schors. Voor ieder gebied moeten we data kunnen vergelijken van in ieder geval vijf muizen. Aangezien we tracing doen van een groot aantal gebieden zullen we per gebied eerst drie oefen injecties moeten doen om recht in het doelgebied te kunnen injecteren. Daarna verwachten we een uitval door niet goed geplaatste injecties van ongeveer 30%. Dit betekent dus **per gebied: $3+5/0.7 = 10$ dieren**. We verwachten in zeven verschillende gebieden inputs te detecteren op basis van de retrograde injecties.

Totaal voor enkele injecties: 70 dieren

Anterograde dubbele injecties

Muis: Transgeen Synaptophysin-tdTomato, Eigen fok. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Injectie: p20-30, perfusie vanaf p35. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken, maar ook vergelijken met de elektrofysiologie. Ook moet het virus enkele dagen tot weken tot expressie komen in de hersenen, dus vanaf 35 dagen oud (voor dieren geïnjecteerd op p20) kunnen we dieren gebruiken.

Voor deze proeven zullen we onderzoeken welke gebieden in de hersenen overlap vertonen in de pontine kernen met de projectie vanaf de motor schors. We kiezen de motorschors omdat dat voor de beantwoording van de vragen onder gedrag de belangrijkste input zal zijn. Ieder input die overlap vertoont met deze projectie zal van belang zijn in de vorming van responsen van neuronen in de pontine kernen tijdens gedrag. Overlap zal vastgesteld worden door injecties te doen met een virus dat de expressie van cre en van een fluorophore drijft. Voor de twee injecties in 1 dieren zullen twee verschillende fluorophores worden gebruikt (twee verschillende kleuren, bv groen en blauw). De cre expressie zal er voor zorgen dat in dezelfde cellen het transgen in de muis actief wordt wat er voor zal zorgen dat de synapsen in deze dieren helder rood kleuren. We krijgen zo dus twee verschillende kleuren axonen met daarin helder rood gekleurde synapsen. Hiermee kunnen we vaststellen of de twee projecties verbindingen maken met dezelfde neuronen in de pontine kernen.

De resultaten behaald met de experimenten beschreven in bijlage 1 zullen leidend zijn in de combinatie van gebieden die we gaan injecteren. In de bijlage 1 hebben we 7 gebieden beschreven waarvan het vermoeden bestaat dat ze projecteren naar de pontine kernen. Om overlap te bestuderen van deze gebieden met de primaire motorschors moeten we dus 6 gebieden onderzoeken in combinatie met de motorschors. Het aantal dieren voor deze proef zal daardoor uitkomen op **60 dieren**. Dit aantal is als volgt vastgesteld: 10 dieren per proef, zeven gebieden minus de motor cortex, dus in totaal $(7-1)*10$ dieren.

Totaal voor dubbele injecties: 60 dieren

Totaal voor injecties: 150 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Dit resulteert op twee onafhankelijke manieren in vermindering: Ten eerste heeft dit ons enige houvast gegeven in het inschatten van de projectiegebieden. Maar de kennis wat betreft inputs naar de pontine kernen is op dit moment zeer beperkt en we moeten dus een eerste injectie doen met retrograde tracers om beter inzicht te krijgen in de aanvoerende gebieden naar de pontine kernen. Voor verdere vermindering is er een limiet geplaatst op het aantal projectiegebieden dat in dit onderzoek onderzocht zal worden. Mochten er meer gebieden van interesse gevonden worden, dan zal eventueel een vervolg onderzoek aangevraagd worden met een onafhankelijke overweging. Ten tweede heeft literatuuronderzoek geresulteerd in een goed inzicht in hoe de injecties gedaan moeten worden wat tot gevolg heeft dat de uitval in alle stadia van de proeven geminimaliseerd is.

Verfijning:

Om onze data zo waardevol mogelijk te maken gebruiken we een transgene muis waarin synaptische contacten zijn gelabeld. Hiermee kunnen we direct synapsen identificeren en hierdoor is het niet meer nodig extra injecties te doen om synapsen aan te kleuren.

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen (o.a. Wet op de dierproeven). Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcordiale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. In het verleden zijn er enkele tracing studies gedaan naar verbindingen naar de pontine kernen, maar deze studies houden geen rekening met vezels die dicht bij de pontine kernen komen, maar geen synapsen maken. Ook is er nog nooit een systematische studie gedaan naar deze projecties. De hier voorgestelde experimenten doen dat wel. Het gaat hier dus om nieuwe inzichten die nog niet eerder verkregen zijn.

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.

Ear bars worden ingesmeerd met pijnstillende crème.
De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn te voorkomen.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht. De kans op slecht herstel na de operatie wordt geschat als zeer klein (<1%).

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig

Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totale (cumulatief) ongerief	100%	Matig

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.

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen in beeld te brengen. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Injectie en slice fysiologie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is de karakterisatie en convergentie op functioneel niveau van de synapsen gemaakt door inputs naar de voorste pontine kernen. Hiervoor zal er gebruik worden gemaakt van optogenetica (lichtgevoelige eiwitten) wat er voor zorgt dat we axonen met een simpele lichtpuls kunnen stimuleren.

We zullen per afferent gebied, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 1, een injectie doen met een virus dat de expressie van optogenetische eiwitten aandrijft. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Ook kunnen we synaptische inputs naar deze neuronen analyseren. Door korte lichtpulsen te schijnen op het hersenplakje kunnen we de axonen die we eerder geïnfecteerd hebben stimuleren om te kijken of er inputs van deze projectie binnenkomen in de cellen in de pontine kernen.

We zullen vervolgens per combinatie van afferente gebieden, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 2, een injectie doen met een virus dat de expressie van deze ionkanalen aandrijft. Dat betekent dus dat een gebied waarmee overlap wordt gezien met de motor cortex in de pontine kernen wordt geïnjecteerd met een virus, terwijl de motor cortex ook een injectie krijgt. De twee gebieden krijgen elk een verschillende variant van het virus geïnjecteerd waardoor motor cortex en het tweede gebied elk met een eigen golflengte licht gestimuleerd kunnen worden. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Door korte lichtpulsen te schijnen op het hersenplakje van verschillende golflengten kunnen we de twee inputs apart van elkaar stimuleren. Hiermee kunnen we dus de convergentie testen op functioneel niveau van twee aparte pathways. Voor deze techniek is het niet nodig dat de plakjes de complete vezelbaan bevatten vanaf het afferente gebied naar de pontine kernen, slechts een kort stuk vezelbaan is voldoende (Jackman *et al.*, 2013)

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteerd in de hersenen met virus. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

De muis zal worden geanestheesd en in een stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt. **Op de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.**

Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken.

B. De dieren

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

Karakterisatie van enkele inputs

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken wat de synaptische eigenschappen zijn van de projecties van allerlei gebieden naar de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met een lichtpuls. Ook kunnen we per cel verschillende experimenten doen door bijvoorbeeld te kijken naar korte-termijn plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen. Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 7 gebieden 5×7 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met enkele injecties: 35 dieren

Karakterisatie van convergentie

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken hoe het samenkomen van verschillende inputs invloed heeft op neuronen in de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de voorste pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met lichtpulsen van verschillende golflengte. Per cel kunnen we de verschillende inputs eerst apart en daarna gecombineerd stimuleren om een duidelijk en compleet beeld te krijgen van hoe inputs samenkomen in de pontine kernen.

Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we dus 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 6 gebieden (7 gebieden min de motor cortex) 10×6 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met dubbele injecties: 60 dieren

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie: 95 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk. Op dit moment is er geen informatie beschikbaar over de synaptische eigenschappen van specifieke afferente gebieden.

Vermindering:

De experimenten worden uitgevoerd nadat eerst is vastgesteld in experimenten vermeld onder bijlage 1 dat er inderdaad input verwacht kan worden uit het projectiegebied. Verder worden de experimenten eerst uitgevoerd vanuit een enkel projectiegebied, waarna pas doorgegaan wordt combinatie van projecties vanuit twee gebieden als aangetoond is dat er input is vanuit beide projectiegebieden. Verder gebruiken we de pilotdata om een inschatting te maken van de projectiegebieden en de opbrengst per dier. Nooit zullen we meer dieren gebruiken dan strikt noodzakelijk om aan te tonen dat er inputs zijn vanuit een projectiegebied of vanuit een combinatie van twee projectiegebieden.

Ook gebruiken we de pilot data om een inschatting te maken van onze opbrengst per dier.

Verfijning:

Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcardiale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Er zijn nog nooit studies uitgevoerd waarbij specifieke afferenten gestimuleerd worden.

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.

Ear bars worden ingesmeerd verdovende zalf.

De hoofdhuid wordt verdoofd.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

In de eerste dag na de operatie zal er eenmaal daags postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig
Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief	100%	Matig

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.

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen te onderzoeken. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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.	11200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Injectie en slice fysiologie

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.

Primaire uitkomst van deze proef is de karakterisatie en convergentie op functioneel niveau van de synapsen gemaakt door inputs naar de voorste pontine kernen. Hiervoor zal er gebruik worden gemaakt van optogenetica (lichtgevoelige eiwitten) wat er voor zorgt dat we axonen met een simpele lichtpuls kunnen stimuleren.

We zullen per afferent gebied, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 1, een injectie doen met een virus dat de expressie van optogenetische eiwitten aandrijft. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Ook kunnen we synaptische inputs naar deze neuronen analyseren. Door korte lichtpulsen te schijnen op het hersenplakje kunnen we de axonen die we eerder geïnfecteerd hebben stimuleren om te kijken of er inputs van deze projectie binnenkomen in de cellen in de pontine kernen.

We zullen vervolgens per combinatie van afferente gebieden, geïdentificeerd door experimenten onder bijlage 2, een injectie doen met een virus dat de expressie van deze ionkanalen aandrijft. Dat betekent dus dat een gebied waarmee overlap wordt gezien met de motor cortex in de pontine kernen wordt geïnjecteerd met een virus, terwijl de motor cortex ook een injectie krijgt. De twee gebieden krijgen elk een verschillende variant van het virus geïnjecteerd waardoor motor cortex en het tweede gebied elk met een eigen golflengte licht gestimuleerd kunnen worden. Vervolgens, na incubatie van enkele dagen tot weken, kunnen we hersenplakjes snijden en in deze plakjes de activiteit van neuronen in de pontine kernen meten. Door korte lichtpulsen te schijnen op het hersenplakje van verschillende golflengten kunnen we de twee inputs apart van elkaar stimuleren. Hiermee kunnen we dus de convergentie testen op functioneel niveau van twee aparte pathways. Voor deze techniek is het niet nodig dat de plakjes de complete vezelbaan bevatten vanaf het afferente gebied naar de pontine kernen, slechts een kort stuk vezelbaan is voldoende (Jackman *et al.*, 2013)

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.

Iedere muis zal worden geïnjecteerd in de hersenen met virus. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal een uur.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

De muis zal worden geanestheiseerd en in een stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt. Op de eerste dag na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Hierna zal het dier enkele dagen tot weken overleven waarna het onder diepe anesthesie zal worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken.

B. De dieren

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

Karakterisatie van enkele inputs

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken wat de synaptische eigenschappen zijn van de projecties van allerlei gebieden naar de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met een lichtpuls. Ook kunnen we per cel verschillende experimenten doen door bijvoorbeeld te kijken naar korte-termijn plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen. Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 7 gebieden 5×7 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met enkele injecties: 35 dieren

Karakterisatie van convergentie

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Injectie: p20, perfusie en meting vanaf p30. Voor deze proeven willen we volwassen dieren gebruiken. Eerder onderzoek laat zien dat vanaf p30 muizen al een goed ontwikkeld en stabiel centraal zenuwstelsel hebben waar weinig tot geen ontwikkeling meer in te ontdekken is in de systemen waarin wij geïnteresseerd zijn. Met deze proeven zullen we onderzoeken hoe het samenkomen van verschillende inputs invloed heeft op neuronen in de pontine kernen. In pilot experimenten hebben we vast kunnen stellen dat de aanpak goed werkt. Per dier kunnen we verschillende neuronen meten (gemiddeld twee per dier) in de voorste pontine kernen, en kunnen we inputs stimuleren met lichtpulsen van verschillende golflengte. Per cel kunnen we de verschillende inputs eerst apart en daarna gecombineerd stimuleren om een duidelijk en compleet beeld te krijgen van hoe inputs samenkomen in de pontine kernen.

Om voor ieder experiment 10 cellen te meten moeten we dus 10 cellen / 2 cellen per dier = 5 dieren gebruiken.

In totaal gebruiken we dus voor de 6 gebieden (7 gebieden min de motor cortex) 5×6 dieren.

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie met dubbele injecties: 30 dieren

Totaal aantal dieren voor elektrofysiologie: 65 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk. Op dit moment is er geen informatie beschikbaar over de synaptische eigenschappen van specifieke afferente gebieden.

Vermindering:

De experimenten worden uitgevoerd nadat eerst is vastgesteld in experimenten vermeld onder bijlage 1 dat er inderdaad input verwacht kan worden uit het projectiegebied. Verder worden de experimenten eerst uitgevoerd vanuit een enkel projectiegebied, waarna pas doorgegaan wordt combinatie van projecties vanuit twee gebieden als aangetoond is dat er input is vanuit beide projectiegebieden. Verder gebruiken we de pilotdata om een inschatting te maken van de projectiegebieden en de opbrengst per dier. Nooit zullen we meer dieren gebruiken dan strikt noodzakelijk om aan te tonen dat er inputs zijn vanuit een projectiegebied of vanuit een combinatie van twee projectiegebieden.

Ook gebruiken we de pilot data om een inschatting te maken van onze opbrengst per dier.

Verfijning:

Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven). Verder zullen alle injecties en transcardiale perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie.

Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Er zijn nog nooit studies uitgevoerd waarbij specifieke afferenten gestimuleerd worden.

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.

Ear bars worden ingesmeerd verdovende zalf.

De hoofdhuid wordt verdoofd.

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.

In de eerste dag na de operatie zal er eenmaal daags postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geevalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Omschrijving	% dieren	Inschaling
Operatie	100%	Matig
Doden onder anesthesie	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief	100%	Matig

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.

Het onderzoek richt zich er op de inputs naar de pontine kernen te onderzoeken. Dit is alleen mogelijk met het snijden van hersenplakjes van muizen die geïnjecteerd zijn. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk.

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	Vul uw	11200
.1	deelnemersnummer van de	
1	Vul de naam van de	Vrije Universiteit Amsterdam
.2	instelling of organisatie in.	
1	Vul het volgnummer en	Volgnummer
.3	het type dierproef in.	Type dierproef
		3 Gedrag

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.

Het doel van de hier beschreven experimenten is het direct testen van de rol van de projectie van de grote hersenen naar de kleine hersenen via de pontine kernen. De eisen voor een taak die de rol van de voorste pontine kernen kan testen is dat de taak activist moduleert in zowel de kleine als de grote hersenen.

De gedragstaak is simpel en heeft twee varianten die verschillende aspecten van gedrag meten. Beide varianten bestaan er uit dat een muis via het hoofd wordt gefixeerd in de opstelling en dat ze een knop moet bedienen met de rechterpoot. De eerste variant van de taak kijkt naar reactietijden, terwijl de tweede variant vooral kijkt naar leergedrag van timing. We kunnen zeer precies, met milliseconden resolutie, het gedrag van de muis onderzoeken. We kunnen zowel de reactietijden van de dieren onderzoeken alswel de precieze beweging van knop indrukken en loslaten omdat de knop een graduele uitlees mogelijkheid heeft (0-100% i.p.v. aan/uit). Tevens kunnen we met deze taak hersenactiviteit opnemen en manipuleren tijdens het gedrag en daarmee een verband vaststellen tussen hersenactiviteit en gedrag.

Tevens is aangetoond dat de motor schors en de kleine hersenen een belangrijke een onmisbare rol spelen bij het uitvoeren van vergelijkbare taken in verschillende dieren (Kubota, 1996; Holdefer *et al.*, 2005; MacKay 1988; Churchland *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2006; Farrand Whislaw 2002; Kan *et al.*, 1994; Esposito *et al.*, 2014; Heming *et al.*, 2016; Tennant *et al.*, 2011; Harrision *et al.*, 2012)

In de eerste variant drukt de muis de knop in om een trial te starten. Na een willekeurige tijd krijgt de muis een cue via een licht of via een toon. In respons op deze cue moet de muis binnen korte tijd

(vastgesteld door de onderzoeker) de knop loslaten om een beloning te krijgen. Deze variant van de taak test vooral de responsetijden van de muis op de cue.

De tweede variant geeft de cue iedere trial na een vaste tijd. Een muis wordt zo bijvoorbeeld getraind om de knop los te laten na 1 seconde. De muis zal leren dat er iedere keer na de start van een trial een 1 seconde wachttijd is voor de cue, en zijn responsetijden aanpassen om zo snel mogelijk na de cue de knop los te laten en zo zijn beloning te maximaliseren.

Voor beide taken geldt dat de muis werkt voor een beloning in de vorm van water. Muizen hebben een restrictie op hun water inname en moeten hun dorst lessen door beloning te verdienen door de gedragstaak goed uit te voeren. Als een muis te langzaam reageert gedurende een trial dan zal dat worden geclassificeerd als een gemiste trial en krijgt de muis een time-out van enkele seconden.

Voor de implementatie binnen ons lab moeten we enkele proeven doen om de opstelling te testen en te kijken en de proef optimaliseren om dezelfde leercurves krijgen. Hiervoor willen we met een beperkt aantal dieren de proef opzetten.

Vervolgens willen we de rol van de pontine kernen testen bij bewegingen door tijdens het gedrag op verschillende momenten de projecties van de pontine kernen te inhiberen met licht. Hiervoor moeten we virus injecteren om optogenetische gereedschappen tot expressie te brengen in neuronen in de pontine kernen. Deze injectie zal tegelijk worden gedaan met het plaatsen van het vastmaak punt op de schedel van de muis. Tijdens gedrag zal er vervolgens via een glasvezel licht worden geschonen in de hersenen van de muis om de projectie van de pontine kernen te inhiberen.

Een laatste deel van dit onderdeel van het project zal er uit bestaan direct de activiteit van neuronen in de hersenen van de muis te meten tijdens gedrag. Specifiek zullen we de activiteit van neuronen in de afferente gebieden meten en vergelijken met de activiteit in de pontine kernen om te onderzoeken welke transformatie van het signaal de pontine kernen verzorgen.

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.

Er zijn verschillende aspecten aan de procedure. Ten eerste moeten de dieren iedere dag gedurende een paar uur vastgezet worden met het hoofd in de opstelling omdat in verdere experimenten er activiteit opgenomen zal worden van hersencellen in het brein en omdat de activiteit van hersencellen zal worden gemeten en worden gemoduleerd met optogenetica. Ten tweede is er het leren van de taak zelf. Ten derde en tenslotte moeten alle dieren die in de proef gaan waterdeprivatie ondergaan. Dit zal er voor zorgen dat de dieren bereid zijn te werken voor een beloning in de vorm van water

Iedere muis zal een implantaat op de schedel krijgen waarmee de muis gefixeerd kan worden in de opstelling. Dit is nodig om in experimenten activiteit te meten van neuronen en om stimulaties te geven met licht in de hersenen van muizen. Iedere muis zal een metalen bevestigingspunt op de schedel krijgen waarmee de muis eenvoudig gefixeerd kan worden in de opstelling. Het totale gewicht van dit implantaat is zeer gering (~2 gram) waardoor het eenvoudig en zonder last door een muis gedragen kan worden.

Verder zal er bij een aantal dieren een virus injectie gedaan worden en zal er een lichtvezel worden geïmplanteerd in de hersenen. Deze twee ingrepen zullen in dezelfde operatie worden uitgevoerd als de plaatsing van het bevestigingspunt.

Bij een aantal andere dieren zullen extra gaten in de schedel worden geboord om tijdens experimenten toegang te kunnen verkrijgen tot de hersenen met elektrodes. De gaten zullen worden afgedicht met een kleine kunststof cilinder met schroefdop, of er zullen direct elektrodes worden geïmplanteerd waarna de schedel weer wordt gesloten met tandarts cement.

Procedure:

Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. De muis zal worden geanestheseerd en in een stereotact geplaatst worden (ear bars zullen worden ingesmeerd met pijnstillende zalf). De ogen zullen tegen uitdroging beschermd worden met oogzalf aangebracht direct op de oogbol. De huid over de schedel zal worden geschoren worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. De schedel wordt verdoofd en daarna goed gereinigd en ontdaan van het periost op de plaats waar het bevestigingspunt geplaatst zal worden. De schedel zal worden opgeruwd.

Vorbereidingen voor optogenetics: Voordat het bevestigingspunt op de schedel zal worden gezet, worden er eerst gaten geboord in de schedel (aan de hand van stereotactische coördinaten) om virus injecties te doen. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna er verder gegaan zal worden met het plaatsen van een lichtvezel. Een dunne lichtvezel (enkele tientallen tot honderden micrometers in diameter) zal worden geplaatst boven het injectiegebied, of boven het doelgebied van de injectie. De vezel zal worden geplaatst met de stereotact aan de hand van stereotactische coördinaten. De vezel bestaat uit een uiteinde dat in hersenen geplaatst wordt en een uiteinde met een bevestigingspunt voor de externe vezel. Het gehele implantaat is zeer kort. Hierdoor loopt de muis in the thuiskooi met slechts een klein uitstekend deel op de schedel (<1 cm) en niet met een lange vezel. Als de vezel op de plaats zit wordt deze kort vastgezet met dental cement. Direct hierna zal doorgedaan worden met het vastmaken van het bevestigingspunt met dental cement. Hierbij zal extra zorg worden gedragen dat zowel de lichtvezel als het bevestigingspunt in 1 structuur van dental cement zullen worden opgenomen.

Vorbereiding voor neuronale recordings: Voordat het bevestigingspunt op de schedel zal worden gezet worden er eerst gaten geboord in de schedel (aan de hand van stereotactische coördinaten) om neuronale opnames te kunnen doen. Na het boren van de gaten worden de gaten afgedekt met een kunststof cilinder met een schroefdop of er zullen direct elektrodes in de hersenen geplaatst worden. De cilinder of elektrodes worden vastgezet met tandarts cement. Direct hierna zal doorgedaan worden met het vastmaken van het bevestigingspunt met tandarts cement. Hierbij zal extra zorg worden gedragen dat alle aangebrachte structuren op de schedel in 1 geheel van dental cement zullen worden opgenomen.

Plaatsing van het bevestigingspunt: Het bevestigingspunt wordt vastgemaakt met tandarts cement. De hoofdhuid zal weer worden dichtgemaakt. In de eerste drie dagen na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

Na implantatie van het bevestigingspunt krijgt de muis enkele dagen voor herstel. Na het herstel zal de muis getraind worden in de opstelling te zitten. Dit zal worden gedaan door de muis kort te verdoven en

direct vast te maken in de opstelling. De opstelling bestaat uit een balkje waarmee het bevestigingspunt vastgemaakt wordt en een buisje waarin de muis zelf zal zitten tijdens het gedrag. Dit buisje is een belangrijk onderdeel omdat uit ervaring blijkt dat de muizen rustiger zijn als ze het idee hebben gedeeltelijk weggekropen te zitten. De pootjes zullen rusten op een balkje of op de knop. De muis zal vervolgens getraind worden gedurende enkele dagen om rustig te blijven zitten in de opstelling en om een beloning te verdienen door het correct uitvoeren van de taak.

De eerste dagen zal de muis alleen maar wennen aan de opstelling en zal er geen gedrag geëist worden voor een beloning. Na de periode van gewenning zal de muis steeds moeilijkere taakjes krijgen. Dus bijvoorbeeld eerst al beloning na het aanraken van de knop, daarna voor het indrukken van de knop, daarna voor het vasthouden van de knop, etc.

Waterdeprivatie zal gedaan worden in overeenstemming met wat er op andere labs in Nederland, en hier op de afdeling al wordt toegepast. Muizen zullen geen water krijgen in de thuishooi, maar hun water moeten verdienen tijdens de experimentele dagen. Informatie uit andere labs [REDACTED] geeft aan dat muizen per dag 25 ul/g aan water nodig hebben om een stabiel lichaamsgewicht te behouden (dus 0.625 ml per dag voor een muis van 25g).

Zolang een muis op een waterdeprivatie protocol staat zal de muis dagelijks worden gewogen voor en na de training/ proef. Dit zal vergeleken worden met het weekgemiddelde. Zakt het lichaamsgewicht van de muis onder 90% van dit weekgemiddelde, dan wordt de muis direct van het waterdeprivatie protocol afgehaald en krijgt het ad libitum toegang tot water. Alleen wanneer het lichaamsgewicht van de muis herstelt tot boven het weekgemiddelde zal de muis terug in de proef gezet worden. Ook zal het gewicht van de muis worden gemonitord over langere tijdsperioden om een langzame teruggang in lichaamsgewicht te voorkomen. Wordt zo'n trend signaleerd dan wordt de moeilijkheid van de taak aangepast, of wordt er extra water gegeven na iedere training/ proef.

In toevoeging op het bovenstaande wordt iedere muis in de proef ook dagelijks gecontroleerd op uiterlijke kenmerken en gedrag. Ervaring binnen de universiteit en vanuit externe adviezen geven aan dat wanneer muizen op een dergelijke manier gemonitord worden er geen uitdroging optreedt met verschijnselen zoals ingevallen ogen, afgenomen elasticiteit van de huid en veranderde activiteit. Zodra één of meerdere van deze verschijnselen zich voordoen zal de muis direct uit de proef genomen worden en ad libitum toegang krijgen tot water tot het dier hersteld is. In deze gevallen zal de IvD direct ingelicht worden zodat ook zij het dier kunnen controleren. Alle criteria van monitoring (gewicht voor en na de training/ proef, inname vocht tijdens de training/ proef, algemene uiterlijke kenmerken) worden vastgelegd voor iedere muis zodat de geschiedenis op ieder moment inzichtelijk is.

Optogenetica proef: Nadat de dieren de taak begrijpen zullen we op gezette momenten de pontine kernen inhiberen met een korte lichtpuls. Gedrag tijdens deze lichtpuls trials zullen we analyseren om te onderzoeken welke aspecten van informatie via de pontine kernen worden doorgegeven. De muis wordt zoals normaal vastgezet in de opstelling en de lichtvezel in de muis zal worden vastgemaakt aan de externe lichtbron. Hierdoor kunnen we met een externe lichtbron licht binnen de schedel van de muis brengen en zo de pontine kernen inhiberen. Lichtintensiteit zal nooit zo hoog zijn dat de hersenen opwarmen of dat er schade optreedt door hoge-intensiteit licht. Bovendien is het licht van een relatief lange golflengte (>400 nm) dus er is geen risico op schade zoals bij UV licht. We meten de reactietijden en hoe de knop wordt ingedrukt (kinematics).

Recording proef: Nadat de dieren de taak begrijpen zullen we beginnen met neuronale afleidingen. We zijn geïnteresseerd in de activiteit van neuronen in afferente gebieden en in de activiteit van de neuronen in de pontine kernen tijdens gedrag. Hiervoor willen we meten tijdens stabiel gedrag (einde van leren), maar ook tijdens herleren van de gedragstaak. Dit kunnen we simpel doen door een muis bijvoorbeeld eerst te trainen op een wachttijd van een seconde en vervolgens te hertrainen op een wachttijd van een halve of anderhalve seconde. Wij verwachten dat activiteit tijdens stabiel gedrag anders is dan gedrag tijdens leren. Door zowel de activiteit in afferente gebieden als in de pontine kernen te volgen kunnen we uitzoeken wat precies de transformatie is die in de pontine kernen plaats vindt en welke rol de pontine kernen hebben tijdens gedrag.

Overzicht:

Dag 0:	operatie, implantatie bevestigingspunt.
Minimaal Dag 7:	begin training, vastzitten in opstelling, start water

	restrictie, water aanbieden in opstelling.
Minimaal Dag 9 en in ieder geval twee dagen na begin training:	Training vastzitten in opstelling, water aangeboden in opstelling.
Tot maximaal dag 21:	Training met steeds complexere gedragstaken totdat de complete gedragstaak goed uitgevoerd wordt.
Uiterlijk op dag 22:	Verzameling gedragsdata en elektrofysiologische data. Maximale duur van verzameling gedragsdata en elektrofysiologische data zal 8 dagen bedragen.

Na afloop van de proef moeten we controleren hoe de elektrodes, lichtvezel of virale injecties geplaatst waren. Hiervoor perfuseren we het dier transcardiaal onder diepe anesthesie. Na fixatie worden de hersenen uitgerepareerd en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor observatie en analyse onder de microscoop.

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

Allereerst om de proef op te zetten gebruiken we een aantal dieren dat iets minder is dan het aantal dieren dat zij gebruikt hebben om de gehele gedragstaak te valideren. We willen immers slechts controleren dat we vergelijkbare uitkomsten krijgen. Vijf dieren zullen genoeg zijn om de opstelling, taak en proef te valideren binnen ons lab.

Voor de optogenetische interventies hebben we gekeken naar de literatuur. In vergelijkbare studies wordt vaak tussen de tien en dertig dieren gebruikt (Zhou *et al.*, 2016; Gunaydin *et al.*, 2014).

Uit dit advies is gebleken dat er ongeveer twintig dieren nodig zijn om statistische verschillen te kunnen detecteren tussen verschillende interventies. De verwachting is dat de optogenetische interventie een extra variantie in de timing van de response aanbrengt van ongeveer 10%. Met een standaard deviatie van 2 milliseconde kunnen we dan met twintig dieren deze verandering detecteren met een power tussen de 70 en 80 procent.

Wat betreft de opnames van neuronale activiteit is in de literatuur het gebruikelijk om op basis van een twintigtal cellen een conclusie te trekken over wat activiteit betekent. Dat betekent dat twintig cellen een statistisch significante modulatie met gedrag laten zien. Die twintig cellen worden dan beoordeeld als representatief voor de populatie van cellen.

B. De dieren

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

Opzetten experimenten:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. Eerder werk wat ik heb gedaan liet zien dat vanaf p30 de schedel volgroeid en stabiel genoeg is om een bevestigingspunt aan vast te maken.

In samenspraak

door gebruik te maken van maximaal vijf dieren. **Totaal aantal dieren: 5 dieren**

Optogenetica:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. Eerder werk wat ik heb gedaan liet zien dat vanaf p30 de schedel volgroeid en stabiel genoeg is om een bevestigingspunt aan vast te maken.

In samenspraak

werd het duidelijk dat we minimaal twintig dieren nodig hebben om verschillen te kunnen opmerken in gedrag. Per dier kunnen we 1 taak testen, dus in totaal hebben we 40 dieren nodig voor het gedrag. De verwachting is dat de optogenetische interventie een extra variantie in de timing van de response aanbrengt van ongeveer 10%. Met een standaard deviatie van 2 milliseconde kunnen we dan met twintig dieren deze verandering detecteren met een power tussen de 70 en 80 procent.

We verwachten dat in een beperkt aantal dieren de lichtvezel en/of de virus injectie niet precies goed

geplaatst zal zijn of dat de dieren de gedragstaak niet (goed) leren. Uit ons overleg met de labs [REDACTED] [REDACTED] verwachten we dit in 25% van de gevallen. Dit betekent dat we 25% extra dieren nodig hebben, dus $40 \times 1.25 = 50$ dieren (40 goed geplaatst, 10 incorrect geplaatst). **Totaal aantal dieren: 50 dieren**

Electrofysiologie:

Muis: Wild-type, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt.

Implanteren van het bevestigingspunt op de schedel vanaf p30. [REDACTED]

Om een goed overzicht te krijgen van de activiteit van de neuronen tijdens gedrag moeten we afleiden van minimaal 20 cellen die taak-gerelateerd zijn. Dit aantal is een standaard aantal in de literatuur om een relatie vast te stellen tussen gedrag en neuronale activiteit. Niet in ieder dier zullen we in staat zijn cellen te vinden die taak-gerelateerd zijn. Ervaring leert dat in ongeveer 50% van de experimenten een taak-gerelateerde cel gevonden zal kunnen worden. Ook moet er in twee gebieden gemeten worden, namelijk in de motor cortex en in de pontine kernen. Dit betekent dat we $20 \times 2 \times 2$ cellen moeten meten tijdens gedrag in evenveel dieren. Daarnaast verwachten we dat in een beperkt aantal dieren de elektrodes niet goed geplaatst zullen zijn of dat de muis de gedragstaak niet leert. Op basis van overleg [REDACTED] [REDACTED] verwachten we dat dit in ongeveer 25% van de dieren het geval zal zijn. Dit betekent dus dat we $80 \times 1.25 = 100$ dieren moeten gebruiken voor onze proeven. **Totaal aantal dieren: 100 dieren**

Totaal aantal dieren: 155 muizen

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.

Vermindering:

We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen en te overleggen en samen te werken met andere labs in binnen en buitenland. Hierdoor hebben we de beste chirurgische en experimentele technieken in huis kunnen halen.

Verfijning:

Alle onderzoekers op het onderzoek zijn zeer goed getraind in de chirurgische en experimentele technieken. We hebben overlegd met [REDACTED] [REDACTED]. Die informatie van deze bronnen hebben ons overtuigd dat we de experimenten uit kunnen voeren met minimaal ongerief en maximale opbrengst qua data per dier.

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.

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijde adequate pijnstilling worden toegepast (zie boven).

Water deprivatie wordt bij muizen breed toegepast als motivationele cue voor gedragstaken. Water deprivatie heeft nauwelijks nadelige effecten op het welzijn van muizen mits de dieren goed gemonitord worden. Wij hebben in overleg met andere labs in Nederland hun systeem van monitoring overgenomen wat er voor zorgt dat de dieren altijd gezond zullen blijven en dat er direct ingegrepen kan worden mocht het dier toch te veel gewicht verliezen. Door het gebruik van de optogenetica of aan het uitvoeren van recordings verwachten we geen extra ongerief.

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.

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. De voorgestelde proeven zijn bedoeld om de gedragstaak op te zetten in ons lab. [REDACTED]

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.

Ear bars worden ingesmeerd met pijnstillende zalf.
De hoofdhuid wordt verdoofd.
Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.
In de eerste drie dagen na de operatie zal er postoperatieve pijnstilling gegeven worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen. Het gedragstaakje is opgezet en getest [REDACTED] en er zijn geen welzijnsaantastingen opgemerkt.
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Herstel van dieren na de operatie zal worden geëvalueerd aan de hand van de volgende criteria: activiteit, houding (pose) en lichaamsgewicht. Indien een dier niet of slecht herstelt na vijf dagen zal het dier geëuthanaseerd worden.

Tijdens de waterdeprivatie worden de muizen dagelijks gemonitord qua lichaamsgewicht.

Ook worden de muizen gedurende de waterdeprivatie gemonitord op uiterlijke kenmerken. Mocht een dier niet herstellen na water deprivatie, zelfs na terugplaatsing op ad libitum water dan zal er overleg met de IvD plaatsvinden waarbij de IvD de beoordeling van de muis zal doen, waarna besloten kan worden tot Euthanasie.

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

<5%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Omschrijving	Duur	% dieren	Inschaling
Operatie	1x	100%	Matig
Eerste trainingen met hoofdfixatie	Maximaal 2 uur	100%	Matig
Uitvoeren gedragstaak na training	2 uur per sessie	100%	Licht
Waterdeprivatie	Max 23 dagen	100%	Licht
Doden onder anesthesie	1x, direct	100%	Licht
Totaal (cumulatief) ongerief:		100%	Matig

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.

Het controleren van de plaatsing van de elektrodes, virusinjectie en lichtvezel is een essentieel onderdeel van deze proef. Dit kan alleen gedaan worden door het dier te doden en de hersenen te analyseren onder de microscoop.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**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
AVD112002017828

Bijlagen

2

Datum 19 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 januari 2017. Het gaat om uw project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD112002017828. 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:

19 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD112002017828

Datum:
19 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11200
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 53815211
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1105
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
19 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 28 februari 2022
Titel project: De pontine kernen in het controleren van bewegingen
Titel niet-technische samenvatting: De Pontine kernen in het controleren van bewegingen
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
19 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD112002017828

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 18 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**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
AVD112002017828
Bijlagen
2

Datum 19 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 januari 2017
Vervaldatum: 18 februari 2017
Factuurnummer: 170828

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD112002017828	€ 1.541,00

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 15 februari 2017 9:32
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828

Beste [REDACTED]
 De documenten zijn goed ontvangen. De aanvraag wordt vrijdag 17 februari door de CCD besproken,
 Groet [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
 E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 14 februari 2017 16:30
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED] Info-zbo
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828

Geachte [REDACTED]
 We hebben vandaag de aangepaste NTS en bijlage 2 via de site geüpload. Het gaat hierbij om: AVD_11200 met de naam: format-nts-Pontine kernen_Correctie (AVD112002017828).pdf en bijlage-beschrijving-dierproeven-2Electrofysiologie_Pontine kernen_Correctie (AVD112002017828).pdf
 We hopen dat de aanvraag tijdens de eerstvolgende CCD vergadering kan worden besproken.
 Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
 [REDACTED]
 Secretaris DEC en Ivd VU-VUmc
 [REDACTED]



From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 9 februari 2017 11:12
To: Info-zbo; [REDACTED]
Subject: RE: vraag bij de behandeling van AVD112002017828
 Excuus, het aanvraagnummer moet zijn AVD112002017828,
 Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
 E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 11:10
Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD114002017828

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw aanvraag: 'De pontine kernen in het controleren van bewegingen' met aanvraagnummer AVD114002017828.

In bijlage 3.4.4.2 is de berekening van het aantal dieren niet helemaal duidelijk. U beschrijft onder B. de dieren bij 'karakterisatie van convergentie' dat u n= 5 dieren per groep nodig heeft, maar komt tot **10** *6 dieren = 60 dieren. Voor de berekening van 'karakterisatie van enkele inputs' gebruikt u wel de berekening van **5***7 dieren. Kunt u de bijlage aanpassen of een aanvulling op de groepsgrootte van 10 dieren geven? Wanneer het aantal dieren niet correct is, moet dat ook in de NTS worden aangepast.

De behandeltijd is opgeschort totdat wij uw aanvullingen hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd uw aanvullingen in te sturen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11200
2. Titel van het project:
De pontine kernen in het controleren van bewegingen
3. Titel van de NTS:
De pontine kernen in het controleren van bewegingen
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *27-10-2016*
 - aanvraag compleet: *27-10-2016*
 - in vergadering besproken: *13-12-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *21-12-2016 en 03-01-2017*
 - advies aan CCD: *18-1-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *27-10-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *14-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Tekstuele opmerkingen bij de NTS, in het voorstel zelf meer informatie over met welk onderzoeksgebied de onderzoeker al ervaring heeft. Bij onderdeel 3.4 staan een aantal onderdelen op de verkeerde plaatst weergegeven. In de bijlagen meer informatie geven over de overwegingen, de injectie, de frequenties, de waterdeprivatie en de humane eindpunten.*
- Datum antwoord: *21-12-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

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

Vraagronde 2

- Datum: *02-01-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen, meer informatie over het maximale ongerief, aantallen kloppend maken in alle delen, de overwegingen met betrekking tot de gedragstaak beter weergeven en check nogmaals goed de spelling.*
- Datum antwoord: *03-01-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *n.v.t.*

3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. De hypothese is dat de pontine kernen informatie integreren en verwerken van verschillende bronnen, en daarom een essentieel onderdeel is van het hersensysteem dat bewuste bewegingen aanstuurt.*

Men wil de hersengebieden die informatie naar de pontine kernen sturen identificeren, en onderzoeken hoe deze informatie wordt verwerkt op synaps-niveau. Daarnaast gaat men onderzoeken hoe informatie van verschillende bronnen samenkomt op neuronon in de pontine kernen en probeert men vast te stellen wat en hoe de pontine kernen bijdragen aan het systeem dat bewuste bewegingen aanstuurt.

Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen. Bewuste bewegingen zijn essentieel voor het leven. Hierdoor hebben aandoeningen waarbij bewegingen zijn aangedaan vaak een grote impact op de kwaliteit van leven. Om bewegingsstoornissen in de toekomst te behandelen moeten eerst de onderliggende oorzaken worden gevonden. Daarvoor is een uitgebreide karakterisatie van de hersengebieden en verbindingen tussen hersengebieden, die ten grondslag liggen aan de aansturing van bewuste bewegingen, nodig.

De fundamentele kennis is nodig om de werking van de pontine kernen beter te begrijpen, en zal bijdragen aan onderzoek naar de behandeling van bewegingsstoornissen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de werking van de pontine kernen, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: N.v.t.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

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

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De

voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling van bewegingsstoornissen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

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

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. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

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

Er wordt licht ongerief verwacht bij alle dieren als gevolg van uitvoeren van de gedragstaak na training, waterdeprivatie en doden onder anesthesie. Matig ongerief wordt verwacht ten gevolge van de operatie (virus injectie) en eerste trainingen met hoofdfixatie. Het cumulatieve ongerief voor alle dieren is matig. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan, in sommige gevallen waterdeprivatie ondervinden en een gedragstaak moeten uitvoeren.

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

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht, gedrag of de dieren niet herstellen na de operatie. De verwachting dat dit zal plaatsvinden is <5%.

3V's

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

Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen, hiervoor zijn intacte hersengebieden nodig. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Met dit onderzoek wil men de fundamentele aspecten rondom bewuste beweging onderzoeken bij zoogdieren, als model voor de mens. De muis is het best bestudeerde model op dit onderzoeksgebied. De hersenen van de muis lijken sterk op die van zoogdieren zoals de mens, hierdoor zijn resultaten van dit onderzoek gemakkelijk te vertalen naar toepasbaarheid in de mens. Daarnaast kan men de resultaten in de muis vergelijken met de resultaten van andere (inter)nationale onderzoekslaboratoria.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het aantal dieren is geminimaliseerd door gebruik te maken van een geoptimaliseerde proefopstellingen en door gebruik te maken van de nieuwste technieken.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 400 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. *Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.*

Zowel vrouwtjes als mannetjes zullen worden gebruikt, in gelijke mate.

19. *Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).*

De dieren worden gedood onder anesthesie, om daarna de hersenen verder te kunnen analyseren.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de basale werking van de pontine kernen en daarmee in de toekomst de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van bewegingsstoornissen het gebruik van maximaal 400 muizen in de dierproef die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een therapie voor de behandeling van bewegingsstoornissen.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 400 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor dit onderzoek is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar de basale werking van de pontine kernen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis over deze pontine kernen en mogelijke behandelingen voor patiënten met bewegingsstoornissen, is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 400 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en indirecte maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de werking van de pontine kernen en zullen indirect bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling van bewegingsstoornissen.

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

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en indirect maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 400 muizen en het daarbij verwachte maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

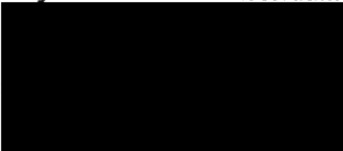
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**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
AVD112002017828
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 18 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" met aanvraagnummer AVD112002017828. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd het aantal dieren in bijlage 3.4.4.2 te controleren. U heeft op basis hiervan bijlage dierproeven 3.4.4.2 en de Niet Technische Samenvatting herzien.

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 "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 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:
AVD112002017828

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: Vrije Universiteit Amsterdam

Adres: de Boelelaan 1105

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "De pontine kernen in het controleren van bewegingen" met aanvraagnummer AVD112002017828, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. 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 18 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 januari 2017, ontvangen op 19 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Anatomie				
	Muizen (Mus musculus) / Transgeen Synaptophysin-tdTomato muis, en Wild Type	150	100% Matig	
3.4.4.2 Injectie en Slice fysiologie				
	Muizen (Mus musculus) / Wild-type	65	100% Matig	
3.4.4.3 Gedrag				
	Muizen (Mus musculus) / Wild-type	155	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD112002017828

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:

AVD112002017828

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:
AVD112002017828

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
nr.	document NTS 2017840	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Project proposal			x						
4	bijlage animal procedure 1			x						
5	bijlage animal procedure 2			x						
6	bijlage animal procedure 3			x						
7	bijlage animal procedure 4			x						
8	Ontvangstbevestiging				x		x			
9	acceptatiebrief				x		x			
10	mail vragen CCD				x		x			
11	vragen CCD aan vergunninghouder				x		x			
12	mail vragen CCD aan DEC				x		x			
13	mailwisseling over vragen				x		x			
14	reactie DEC op vragen				x		x			
15	DEC advies initieel				x		x			
16	DEC advies aangepast				x		x			
17	Project proposal definitief			x						
18	bijlage animal procedure 1 definitief			x						
19	bijlage animal procedure 2 definitief			x						
20	bijlage animal procedure 3 definitief			x						
21	bijlage animal procedure 4 definitief			x						
22	NTS definitief	x								
23	Advies CCD aan bestuur		x							x
24	Beschikking				x		x			

24 JAN. 2017



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 30100	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	40530817
		Straat en huisnummer	Plesmanlaan 121
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>	Postbus	90203
		Postcode en plaats	1006 BE Amsterdam
		IBAN	NL71DEUT0626343534
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
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 | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantie voor Dierenwelzijn | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 2 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Functional analysis of genes implicated in cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Functionale analyse van genen betrokken bij kanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | NKI |
| Postadres | t.a.v. [REDACTED] Postbus 90203;1006 BE; Amsterdam |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684,- 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
-


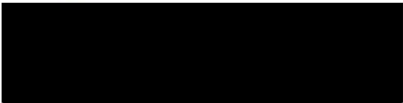
6 Ondertekening

- 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	Instantie voor Dierenwelzijn
Plaats	Amsterdam
Datum	20 - 1 - 2017
Handtekening	



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Functionale analyse van genen betrokken bij kanker
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Genfunctie, ontwikkeling, ontregeld, kanker, muismodel

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld en heeft grote gevolgen voor de maatschappij met betrekking tot individueel en algemeen welbevinden. Ook de gevolgen in economische zin zijn niet te onderschatten. De missie van ons instituut is het verminderen van kankerincidentie en het verbeteren van de behandeling van kankerpatiënten. Kanker is een verzameling van ziektes, die wordt gekenmerkt door een ontspoord gedrag van cellen waardoor de normale lichaamsfuncties worden verstoord en de patiënt kan komen te overlijden. Deze afwijkingen in het gedrag worden veroorzaakt doordat genen die betrokken zijn bij de regulatie van celdeling, cel beweging, celdood, etc. niet goed functioneren. Klinisch en fundamenteel onderzoek aan een breed scala van tumoren heeft een groot aantal genen geïdentificeerd die frequent ontregeld zijn in de ontwikkeling van kanker. Bij ontregeling kan het gaan om overactiviteit van genen dan wel
---	---

om vermindering of zelfs verlies van gen activiteit. Met de toenemende effectiviteit van genoom analyse technieken zullen nog vele genen hieraan toegevoegd worden.

Niet duidelijk is wat de rol van de ontregeling van deze genen is. Het doel van dit project is fundamentele kennis over de normale functie van deze genen. Deze kennis is essentieel voor het begrip van hun ontregeling voor de ontwikkeling van kanker en levert op termijn mogelijk nieuwe aanknopingspunten voor therapeutische interventie. Bovendien kan met deze kennis ingeschat worden wat de gevolgen van deze (gen) specifieke interventie kunnen zijn voor normale cellen en daarmee voor de patiënt. In dit project willen wij de normale functie van de in kanker ontregelde genen bestuderen in muismodellen. Hiertoe worden modificaties in deze genen geïntroduceerd in muizen en de gevolgen hiervan voor de normale ontwikkeling van deze muizen geanalyseerd. De muis is qua genetische opbouw vrijwel identiek aan de mens en is daarom een goed model voor deze studies.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Wij verwachten dat we met dit project een schat aan fundamentele kennis opdoen over de normale functie van, in kanker frequent ontregelde, genen in de normale ontwikkeling van de muis en daarmee in de ontwikkeling van de mens. Deze kennis zal ons in staat stellen de betekenis van hun ontregeling voor de ontwikkeling van kanker beter te begrijpen. Bovendien zullen de effecten van eventuele therapeutische interventies gericht op de functie van deze genen op gezonde cellen en daarmee de patiënt beter ingeschat kunnen worden. De resultaten van dit project zullen leidend zijn voor het opstellen van vervolgstudies waarin de rol van de ontregelde genen in de ontwikkeling van kanker op zichzelf en in de effectiviteit van therapeutische interventie bestudeerd zal worden. Voor de dierexperimenten nodig in deze vervolgstudies zullen separate CCD licenties aangevraagd worden.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Diersoort: Muis (mus Musculus)
Geschat aantal: $2050+2350+9000+2880 = 16280$

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

-In dit project worden genetisch gemodificeerde dieren fenotypisch gekarakteriseerd. De dieren ondervinden hiervan geen ongerief behalve wanneer de genetische modificatie op zichzelf tot ongerief leidt. De aard en het niveau van dit ongerief is niet te voorzien, maar door de frequente monitoring als onderdeel van de verzorging zal het ongerief beperkt blijven tot matig.
-In dit project worden geen chirurgische ingrepen uitgevoerd behalve in een zeer klein aantal dieren waarbij de genetische modificatie later in een deel van het lichaam wordt geïntroduceerd. Het ongerief zal hierbij niet hoger zijn dan matig.
-Een zeer klein deel van de dieren zal betrokken zijn bij de studies van genen in weefselherstel. Deze dieren kunnen matig ongerief ondervinden.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Licht ongerief in ca: 11825 (73%)
Matig ongerief in ca: 4455 (27%)

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden gedood en de weefsels worden gebruikt in het kader van de doelstellingen van het onderzoek.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Bij het ontstaan van kanker zijn een groot aantal genen ontregeld. Met het vooraf verrichten van uitgebreid pathologisch en 'in vitro' onderzoek selecteren we die genen waarvan de ontregeling waarschijnlijk kanker veroorzaakt dan wel de progressie ervan. In dit project willen we de normale functie van deze genen bestuderen in de ontwikkeling van een compleet/intact dier. Er zijn geen alternatieven hiervoor.
-
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- De ontwikkeling van de muis is tot in detail bekend en de analyse van eventuele afwijkingen hiervan in genetisch gemodificeerde dieren behoeft geen grote aantallen experimentele en controle dieren. Daarom blijft de groepsgrootte in iedere studie zeer gering.
-
- 4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De keuze voor de muis als proefdiermodel komt voort uit de volgende overwegingen: (1) De muis vertoont qua orgaanstructuur en genetische opbouw grote overeenkomsten met de mens. (2) Voor dit onderzoek belangrijke moleculair biologische technieken kunnen alleen in deze diersoort efficiënt worden uitgevoerd. (3) Er zijn veel verschillende stammen beschikbaar. (4) Het is een goed toegankelijk proefdier dat goed te houden en te hanteren is.
-
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- De handelingen met de dieren worden enkel uitgevoerd door ervaren, gekwalificeerd personeel.
Alle chirurgische handelingen die kunnen leiden tot ongerief of pijn worden onder adequate anesthesie en analgesie uitgevoerd. Er vindt nauwgezette postoperatieve monitoring plaats van de muizen en humane eindpunten worden toegepast. Alle beschikbare middelen om ongerief te vermijden of verminderen worden toegepast.
-

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.

Cancer is caused by malfunctioning of genes regulating cellular processes e.g. cell division, differentiation

and migration. Normally these processes are properly controlled by adequate integration of gene activities in a complex network of signalling pathways. Changes in activity of these genes by mutation, under- or overexpression can result in an imbalanced pathway network leading to aberrant cell behaviour, e.g. uncontrolled proliferation, mobility, and ultimately to cancer. Notably, in tumors of distinct origin often the same pathways are affected by changes in different genes functional in these pathways.

Cancer research over the last decades comprised detailed genomic analyses of tumors from patients and animal models and large numbers of 'in vitro' and 'in vivo' screening approaches. This research has resulted in the identification of a large number of genes and genetic elements controlling them implicated in many different cancer types. However, since genomic analyses often occur at end stage tumor material the identification of these genes as such provides an essential but limited contribution to our understanding how they are involved in the tumorigenic process. For this, thorough functional study of these genes and genetic elements involving both 'in vitro' and 'in vivo' (animal) experiments in normal and oncogenic conditions is required. This yields fundamental knowledge necessary for understanding their possible role in tumor onset, development and progression, which is crucial for translational application in diagnostics and development of therapeutic intervention modalities.

The list of identified cancer genes to date is far from complete and with the still exponential growing potential of genome sequencing, screening and tagging technologies many new genes implicated in cancer development will be identified in the years to come. In this project we will select candidate genes and genetic elements on the basis of published data, e.g. cancer genomic databases from human and other species, and of data from in vitro and in vivo screening and tagging experiments. We want to acquire fundamental knowledge about the normal physiological function of (combination of) these genes and genetic elements by studying the phenotypic effects of controlled (expression) modification at the level of whole animals and at the cellular level, i.e. in GGO mice and cell cultures derived from them, respectively. This will be done in mice carrying the genetic modification in all cells (germ line modifications) or in mice in which the genetic modification is introduced in a tissue and/or temporal specific fashion (conditional modifications). In the latter situation we will also make use of reporter systems that enable to follow the modified cells in the course of development. Already available mouse strains carrying alleles with appropriate modifications will be imported. New strains will be generated in our institute under a separate license.

In general, the functional characterization of selected genes will initially entail the following aspects: viability of germ line modification, Mendelian transmission of the modification, phenotyping of the modified mice, comparison of their behaviour with wild type control mice and thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In addition, we will derive cell cultures from modified mice to study the effects of the changed gene expression at the molecular and cellular level. The results of these analyses will be leading in the choice from which tissues from the modified mice cell cultures will be derived.

In case germ line modification of selected genes is not viable or certain strong phenotypes preclude the detailed analysis of other, more subtle phenotypes, we will make use of conditional technology enabling temporal and tissue specific gene modification. Examples of early embryo lethality of germ line knockout alleles (see references), which show clear (cancer) phenotypes when alleles are inactivated at adulthood and/or in specific tissues unnoticed in studies of embryo development: pRb, PTEN, APC, Brca1 and BRCA2 (see references below).

References

- Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, te Riele H. Nature 1992, 359: 328-330, Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development.
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Nat Genet. 1998,19: 348-355, Pten is essential for embryonic development and tumour suppression.
- Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, Kobayashi M, Itakura C, Taketo M. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 9;92: 4482-4486, Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene.
- Hakem R, de la Pompa JL, Mak TW. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1998 3:431-445, Developmental studies of Brca1 and Brca2 knock-out mice.

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 objective of this project is to acquire fundamental knowledge about the normal, physiological function and their role in cellular signaling pathways of specific genes of which the activity is frequently deregulated in cancer development. This knowledge is essential to understand how this deregulation could affect the cross talk with other genetic lesions leading to tumorigenesis. Furthermore, these studies are necessary to predict the consequences of eventual therapeutic intervention strategies specifically targeting the activity of these genes. Moreover, this knowledge will provide essential leads for subsequent research projects for which eventually separate CCD license applications will be assembled. Under this project we will analyze the role of these genes selected on the basis of their data based relevance for tumor development, each in a separate study. In all these gene specific studies we will follow the same routine procedures: phenotyping of the modified mice, thorough histo-pathological and molecular analyses at different ages and characterization of cell cultures derived from these mice. The results of these studies together with existing data will be leading in designing subsequent 'in vivo' experiments addressing the oncogenic effects of (combinations of) deregulated genes thereby validating their role in human cancers and providing (animal) models for testing therapeutic intervention modalities. These subsequent experiments will be described in additional license applications. We think we can achieve this objective since our institute holds both the scientific knowledge and technological expertise for these studies: a modern state of the art animal facility including internationally recognized transgenic and imaging facilities embedded in the NWO Roadmap funded MCCA, a well trained staff taking care of animal husbandry, a dedicated animal pathology department with two mouse pathologists supported by a well-equipped pathology lab with all histological technologies available. In addition, all research departments within our institute have access to cell culture facilities, sophisticated digital microscopy (confocal, live-imaging, etc.) and flow cytometry facilities.

3.3 Relevance

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

Scientific: To understand the role of genes identified in large genomic and screening/tagging approaches in the process of cancer onset and progression it is essential to know what the functional role of these genes is in normal development and physiology. This knowledge is also crucial to set up therapeutic

intervention strategies targeting the cellular pathways in which these genes are active.

Social: Cancer has a major negative impact on health / wellbeing of many people. Moreover, the morbidity also has considerable negative economic consequences. There is an urgent need to improve existing treatment strategies since many of them have serious side effects, which limit their full application, since they are often based on targeting (generic) cellular processes also essential for normal healthy cells. Cancer research over the last decades has resulted in the identification of many genes causally implicated in cancer development, thereby providing many possible specific targets for new therapy modalities. The knowledge of the normal function of these genes is essential for the development of targeted therapeutic intervention strategies in evaluating their effectiveness and serious adverse effects. As an illustration of the relevance of these studies see below a short list of publications describing the phenotype of mice carrying modifications in cancer implicated genes and the possible adverse effects as a consequence of therapeutic intervention targeting their activity.

-Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J, Berns A. 2004, Mol Cell Biol. 24: 6104-6115, Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors.

-An N, Kraft AS, Kang Y. 2013, J Hematol Oncol. 6:12, Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice.

-Zhang HW, Ding J, Jin JL, Guo J, Liu JN, Karaplis A, Goltzman D, Miao D. 2010, J Bone Miner Res. 25: 640-652. Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice.

-Gu M, Shen L, Bai L, Gao J, Marshall C, Wu T, Ding J, Miao D, Xiao M. 2014, Age 36: 129-139. Heterozygous knockout of the Bmi-1 gene causes an early onset of phenotypes associated with brain aging.

3.4 Research strategy

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

In this project we want to characterize the normal function of cancer related genes in development and physiology at the level of a complete animal. As such the project comprises of many different smaller studies each focusing on a specific gene, gene family or element or set of complementing genes. These studies share the relationship with and relevance for cancer and in practice they follow the same course of straightforward experiments. For a schematic overview of the route each study will follow see flow chart.

Each study starts with the selection of a particular cancer related gene on the basis of existing data indicating their relevance for (human) cancer. For each gene project the following steps will be carried out:

- First we will search literature and depositories for already available mouse strains carrying the gene modification of interest. If available at other laboratories or depositories we will import these mice, if not we will generate the mouse strains in the MCCA facility in our institute and perform the welfare assessment of newly generated GM mice according to the European guidelines. The procedures to generate GM themselves are described in a separate license application from our institute (*'Generation and cryopreservation of genetically modified mouse strains'*).

According to the *'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren'* (Versie: oktober 2016), the welfare assessment of newly

generated genetically modified mouse strains does not require a CCD license upfront, but a license is required for newly genetically modified mouse lines when they exhibit an affected phenotype in their welfare assessment. Beforehand we cannot predict whether the modification of cancer related genes selected for further investigation will lead to an affected phenotype. However, we estimate that up to 10% of the newly generated modified mouse lines might exhibit an affected phenotype and we only apply for a CCD license for this number of mice (appendix 1). The estimation of 10% is based on our own experience and on published data from large phenotyping consortia (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514, High-throughput discovery of novel developmental phenotypes).

- In case germ line modifications preclude the analysis of subtle or cell type specific functions at later stages, e.g. in case of embryonic lethality, we will introduce the gene modifications in a temporally controlled and/or tissue/cell type specific fashion. For this we will make use of conditional targeting technology. This approach requires the generation of conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various 'switch' genes enabling controlled activation of gene modifications. Alternatively, 'switch' genes may be introduced somatically (e.g. using viral vectors). These 'switch' genes include sequence specific recombinases (e.g. Cre and Flp) or gene editing systems (e.g. Crispr/Cas). In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated, thereby refining the read out of the experiments. Mouse strains carrying 'switch' alleles and reporter alleles will be referred to as 'tool box' strains. Mouse strains involved in these analyses, i.e. those carrying conditional alleles for the genes of interest, and the 'tool box' strains will either be imported or generated in our transgenic facility. In the latter case, experiments validating their effectiveness will be executed. Validation of these strains and additional technology enabling conditional modification will be described in appendix 2.
- To study the effects of gene modification in all cells of the mouse we will set up cohorts of germ line modified mice and appropriate controls. First we will monitor viability and Mendelian transmission. In case the germ line modification is viable we will follow the modified mice over time and score for aberrant development and behavior. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In cases of genes that have similar (redundancy, e.g. gene families) or complementary molecular activities we might need to combine modification of gene family members or complementing genes in order to uncover their physiological function. If germ line modification is not viable we will first characterize the phenotype at different stages of gestation. For this we will set up breeding pairs to produce pregnant females carrying modified and control foetuses. In case we want to study gene function at later stages and in specific tissues/cell types we will take the conditional approach and we combine the necessary genetic components to generate the experimental and control cohorts of mice. Decision on timing and tissue/cell type specificity will also be based on the tumor type in which the gene of interest was found to be implicated in addition to their expression profile and other data. After inducing the gene modifications mice will be followed over time and scored for aberrant development and behavior. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis. In addition to these analyses we will derive cell cultures from modified mice to study the effects of the genetic modification on a cellular and molecular level under strictly defined conditions.
All these phenotyping and molecular characterization experiments will be described in appendix 3.
- The phenotypic analysis described in appendix 3 will be done on mice kept under standard conditions, not treated in any way. However, existing data from other sources and the results of the analyses described in appendix 3 may indicate that for some genes their function can only be uncovered when

the modified mice or tissues/cells derived from them are exposed to challenging conditions. This might especially be the case when they have a role in stem cell performance supporting tissue homeostasis and regeneration, which as such is also relevant for tumor maintenance. Appendix 4 describes short term pilot experiments involving challenging conditions to obtain the leads for separate, additional license applications that address on a broad scale and in greater depth the function of these genes under specific conditions.

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 procedures for the generation of genetically modified mouse strains are covered by a separate protocol from the transgenic facility of our institute. Appendix 1 describes the initial welfare assessment of newly generated mouse strains.

The required modifications and technology for conditional induction of genetic modifications will be validated as described in appendix 2 before setting up cohorts for phenotypic characterization of mouse strains carrying modified cancer related genes.

This phenotypic analysis is described in appendix 3 and requires the set up of experimental and control cohorts by conventional breeding procedures. When mice carry conditional modifications, mice will undergo treatments activating the genetic modification of interest. Mice will be closely monitored over time. At increasing ages mice will be sacrificed and total necropsy will be performed. All tissues will be carefully analyzed by molecular and histo-pathological assays. For 'vitro' studies we will also derive cell cultures from the genetically modified mouse strains.

In a minority of cases genetically modified mice or tissues/cells derived from them will be studied in vivo under challenging conditions as described in appendix 4. These experiments address the role of genes primarily involved in tissue regeneration and include transplantation procedures.

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

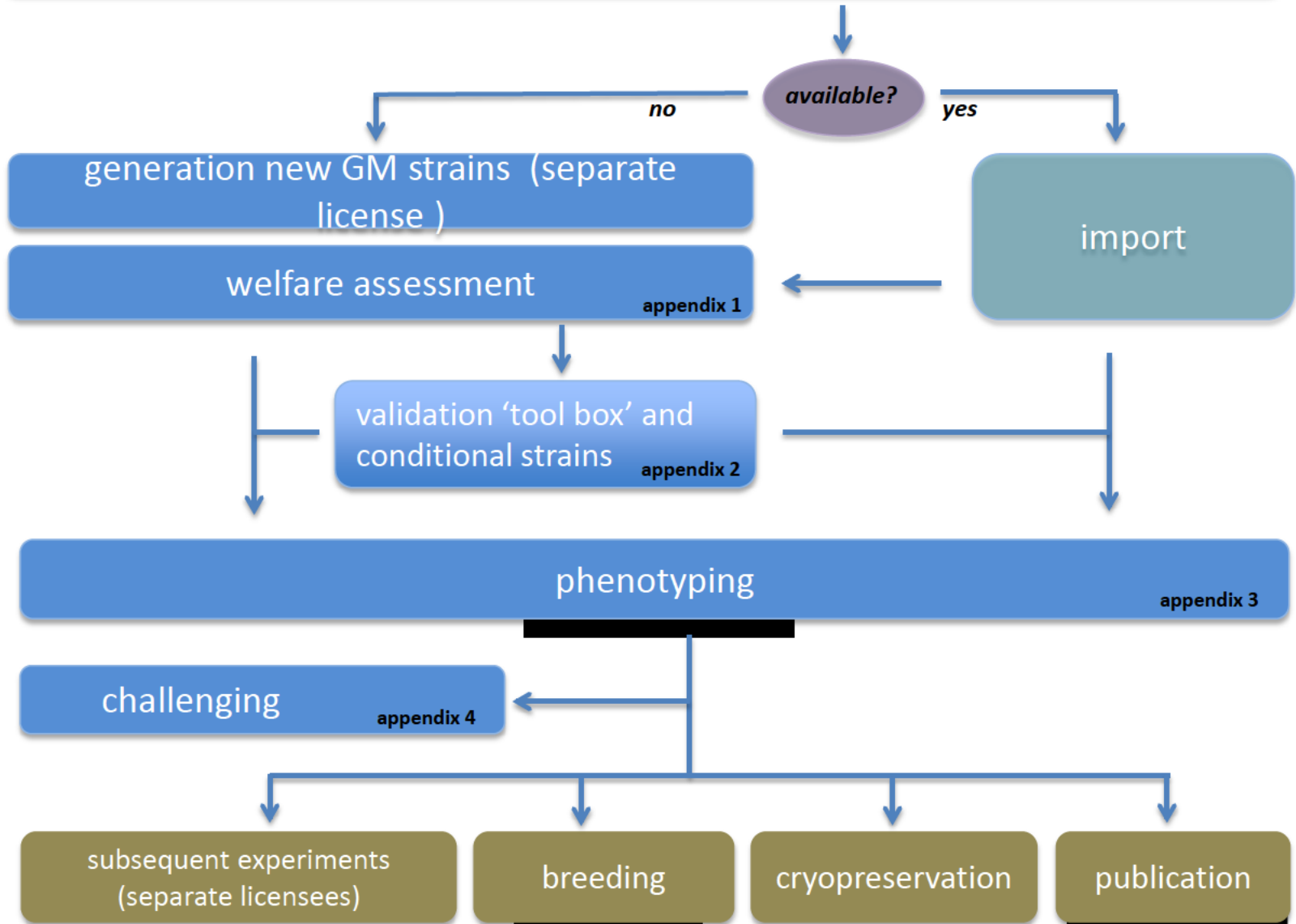
The flow chart presents an overview of how the project is organized. The coherence of the project is reflected by the fact that each study will take the same approach and consists of a preparation phase and an analytical phase in which the same experimental procedures are followed. In the preparation phase for each study the mouse strains carrying the genetic modification of interest are acquired, their welfare assessed and validated in case of 'tool box' strains (appendices 1 and 2). The analytical phase (appendix 3 and 4) for each separate study follows the same procedure: setting up appropriate cohorts, activation of the modifications if needed, phenotyping at different ages/stages, thorough molecular and histo-pathological characterization and cell culture derivation for ex vivo experiments (appendix 3). In a limited number of these studies the analysis phase will include the characterization of modified mice under challenging conditions (appendix 4). In the analytical phase also cell cultures will be derived from the genetically modified mice.

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	Welfare assessment of new genetically modified mice
2	Validation of conditional genetic modification technology
3	Phenotyping of mice carrying germ line or temporal and/or tissue specific genetic modifications
4	Functional analysis of genetic modifications in mice under challenging conditions

5	
6	
7	
8	
9	
10	

Selection cancer implicated genes to be phenotyped:
-literature, open data bases, etc
-own data: screening, tagging, etc





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'. 30100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | General welfare assessment of newly generated genetically modified (GM) mice |

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.

Creation of genetically modified (GM) mice will take place via 1) classic transgenesis with DNA injection into zygotes, 2) genome editing technologies (e.g. CRISPR/Cas) in pre-implantation embryo's or 3) injection of genetically modified embryonic stem cells into blastocysts. These procedures will be performed under a separate protocol from our transgenics facility. Basic welfare assessment for the novel (compound) mouse models, for 2 breeding cycles from F2 onwards, is performed according to the guidelines of the new EU directive. Some combination lines will be obtained by conventional crossing of generated lines. New combination lines will be screened for two generations and monitored for spontaneous phenotypic abnormalities.

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

1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification:

a. Toe clipping is performed at 5-7 days after birth OR

b. Ear clipping is performed after weaning. In order to improve the precision of the earmarks this is done under anesthesia according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always

all mice need to be genotyped shortly after birth.

In rare cases genotyping has to be repeated using an additional biopsy; this will be done by tail clipping under anesthesia according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

2) Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

3) Animals are killed according to SOP ('euthanasia of mice') from the animals facility for instance because they do not have the right genotype or display unacceptable suffering.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

Numbers: Based on our experience of the last 5 years, for the creation of a new GM mouse line we use on average up to 150 mice (according to the "Besluit Biotechnologie"). However, as the generation of the genetically modified strains per se will be performed under a different protocol from our transgenics facility (MCCA), we do not include these numbers in this current protocol.

The founder generations (F0) obtained from the transgenics facility consist on average of 30 animals per GM line.

For each germ line modification typically three independent founders are selected and initially bred to wild-type (e.g. FVB or B6) mice to create an F1. We will aim to generate substantial numbers of homozygous mice in the next generation (F2). Generations F2 to F4 will undergo an initial welfare assessment. The F4 is included in order to assess the full reproductive cycle over two generations, including gestation in homozygous parents (which does not usually apply to the F2). To have at least 7 males and 7 females for welfare assessment of each generation, we assume at least three litters (average size 7 pups) per generation will need to be generated. Assuming 30 mice for the F0, 30 for the F1 and F2 (to obtain sufficient numbers of male and female homozygous F2 mice), this yields $30 + 3 \times 10 + 3 \times 10 + 3 \times 21 + 3 \times 21 = 222$ mice per genetic modification. Based on our experience from the last decade we expect to generate 50 germ line modified mouse lines for which we will need $50 \times 222 = 11100$ mice for welfare assessment.

For each conditional modification typically 2 independent founders will be selected. For welfare assessment we will need $30 + 2 \times 10 + 2 \times 10 + 2 \times 21 + 2 \times 21 = 154$ mice per modification. Based on our experience from the last decade we expect to generate 25 conditionally modified mouse lines for which we will need $25 \times 154 = 3850$ mice for welfare assessment.

For each modified mouse line instrumental in the activation and/or tracing of conditional genetic

modifications ('tool box' mouse lines) 3 independent founders will be selected. For welfare assessment we will need $30 + 3 \times 10 + 3 \times 10 + 3 \times 21 + 3 \times 21 = 222$ mice per modification. Based on our experience from the last decade we expect to generate 25 mouse lines instrumental in conditional genetic modification for which we will need $25 \times 222 = 5550$ mice for welfare assessment. In total we will need 20500 ($11100 + 3850 + 5550$) mice for the welfare assessment of 100 new genetically modified mouse lines. However, only for the lines that show an affected phenotype a CCD license is required. We cannot foresee of which lines the phenotype will be affected but we estimate that of up to 10% of the lines this might be the case. This figure is based on our own experience and published data from large phenotyping consortia (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514, High-throughput discovery of novel developmental phenotypes). Therefore, we need $0,10 \times 20500 = 2050$ mice licensed in this appendix.

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.

- Generation of a new (compound) GM line is carefully considered in advance and should in principle yield new information that can only be obtained by studying the effects of the change of gene activity in a complete animal. In addition, the precise genetic modification should be backed up by solid data and evidence, which can be obtained from a variety of sources, such as genetic screens, in vitro experiments or clinical (large-scale) patient data.
- Before a new GM mouse line is created, we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already available GM strains of the same gene or locus. Duplicate mouse strains are not produced.
- The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11):1755-85. doi: 10.1038).
- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryo's and ES cells from the relevant background. As a result the differences in genetic background of the experimental mice and control mice will be as small as possible thereby increasing the significance and reproducibility of the welfare assessment data.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in

individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when signs of distress are observed.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia will be applied during ear or tail clipping according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The purpose of this appendix is to assess the welfare of mice carrying (conditional) modification in genes of unknown function. We cannot exclude the occurrence of adverse effects in some of the generated (compound) modified mouse strains. However, based on our 30 years' experience in this type of studies we expect that less than of 10% of the animals the phenotype will be affected and half of these might

suffer unexpected discomfort. The nature of the adverse effects and level of discomfort is unpredictable. Rarely, mice are born (the F0 founders) with elephant teeth or showing a severely retarded development, but this also occurs during normal breeding.

In all cases mentioned above the affected animals will be killed immediately in order to limit the discomfort level to moderate.

Explain why these effects may emerge.

In addition to the developmental and physiological consequences of the gene modifications for the handlings of the embryo's or ES cells (e.g. micro-injection or modification per se of ES cells) during the modification procedure might perhaps cause improper development in exceptional cases that emerge in the F0 founders.

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

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

When discomfort reaches the level of moderate, mice will be euthanized.

Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than moderate due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience and published data (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514) only a small fraction (<5%) of genetically modified mouse strains might have spontaneous discomfort higher than mild.

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').

-GM mice, during welfare assessment: mild (or less) 90%, moderate: <10%

- Mice undergoing ear or tail clips: mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'. 30100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 2 | Validation of conditional genetic modification technology |
- 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.

In case germ line modifications preclude the analysis of subtle or cell type specific functions at later stages, e.g. in case of embryonic lethality, we will introduce the gene modifications in a temporally controlled and/or tissue/cell specific fashion. For this we will make use of conditional technology. This approach requires the generation of conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various constitutive or inducible 'switch' genes (e.g. recombinases such as Cre, Flp) that activate the genetic modification in conditional genes. Alternative approaches that introduce the 'switch' genes somatically will be involved as well. For example, the use of viral vectors carrying cell type specific promoters driving 'switch' gene expression. In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated thereby refining the read out of the experiments.

Mouse strains carrying 'switch' gene alleles and reporter alleles will be referred to as 'tool box' strains. The functionality of these 'tool box' strains needs to be validated as well as functionality of the conditional modified mouse strains. Conditional genetic modifications should not lead to any phenotype but should serve efficiently as a substrate for 'switch' genes. Validation of these mouse strains and of alternative routes for 'switch' gene introduction will be described in this appendix 2.

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

For the validation of each 'tool box' strain, conditional strain or application to introduce 'switch' gene systems breeding pairs will be set up in order to obtain the experimental mice with the appropriate genotype. New 'switch' gene alleles will be combined with a validated reporter allele and new reporter alleles and new conditional alleles with a validated 'switch' gene allele. The validation experiments in case of somatic introduction of 'switch' gene systems will be directly done on validated reporter mice. Once the mice with the proper genotypes are available, the following procedures will be performed.

- 1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification
 - a) toe clipping is performed at 5-7 days after birth OR
 - b) ear clipping is performed after weaning. This is done under anaesthesia according to SOP. The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always all mice need to be genotyped shortly after birth.
 - c) tail clipping after weaning under anaesthesia according to SOP (sometimes required to obtain sufficient DNA for careful assessment of the structure of transgene insertions).
- 2) Overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behaviour, relative size, breeding parameters and clinical signs will all be assessed.
- 3) Generation of experimental cohorts in which the necessary genetic elements are combined (e.g. 'switch' gene alleles and reporter alleles).
- 4) Animals are euthanized according to SOP; tissue/cells will be subjected to further molecular and histological characterization directed at the following aspects:
 - expression level and tissue/cell type specificity of 'switch' gene alleles
 - functionality of 'switch' genes using validated reporter alleles as substrates
 - inducibility of 'switch' genes using validated reporter alleles
 - functionality of somatic delivery of switch genes using validated reporter alleles
 - functionality of reporter alleles using validated 'switch' gene alleles
 - functionality of conditional alleles
- 5) In case of inducible gene modification animals will be exposed to the appropriate inducing agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):
 - a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
 - b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
 - c) oral administration (maximally 5 times)
 - d) topical application on the skin under anaesthesia according to SOP (maximally 3x)
- 6) For somatic introduction of gene modifications, various formulations of 'switch' gene systems can be used e.g. viral vector suspensions, liposome suspensions and DNA, RNA and proteins formulated in various solvents. In case the introduction of these systems will raise an immune response against the cells that have been targeted (e.g. viral vectors generating foreign antigens) we will supplement the drinking water of the mice with immune suppressants. For somatic introduction of the 'switch' gene systems, mice will be subjected to either one of the following procedures:
 - a) injection either sub-cutaneous, intra-peritoneal, intra-muscular, intra-venous, intra-thoracic; if necessary under anaesthesia according to SOP (1x)
 - b) introduction under anaesthesia according to SOP without surgery via either one of the openings in the

- body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland (1x)
c) surgical intra-cranial installation under anaesthesia and analgesia according to SOP (1x)
d) tattoo of the skin under anaesthesia according to SOP (maximally 3x).
e) shaving of the skin and topical application (ointment) (maximally 3x)
7) Blood sampling according to SOP at different time points after activation of the genetic modification.

None of the listed procedures causes a discomfort level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation. Only a very small number of mice will be involved in this procedure (< 0,5%)

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behaviour and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. The institute is a license holder with NVWA.

We expect to functionally validate 25 new 'tool box' strains (10 carrying constitutive active 'switch' gene alleles, 10 inducible active 'switch' gene alleles and 5 new reporter alleles) and 25 new conditional alleles. In addition, based on the experiments during the last 5 years during which a broad range of conditional technologies has been applied, we fore see to analyse the effectiveness of 25 new strategies to somatically introduce 'switch' gene systems.

For functional analysis of new 'switch' alleles we have to set up groups of mice in which new 'switch' alleles are combined with validated 'reporter' alleles. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents)

To validate inducibility of 'switch' alleles we will test on average 5 conditions and the read out will be done using reporter mice as described above.

For validation of new 'reporter' alleles we have to set up groups of mice in which new 'reporter' alleles are combined with validated 'switch' alleles. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents).

For each new application to somatically introduce 'switch' alleles (e.g. viral) we will use on average 5 variables. For these experiments we will use validated 'reporter' strains. The nature of the variables depends on the application (e.g. dosage).

To validate the functionality of conditional alleles we will combine the new conditional allele with validated 'switch alleles'. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents).

According to the *'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren'* (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice involved in these experiments are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

The numbers are based on a group size of 5 animals for all of these analyses as in our experience this number is sufficient to draw firm conclusions.

nr mice needed	analysis	breeding
Tool box lines		
<i>Constitutive activity</i>		
Expression analysis	5	15
Functional analysis:	5	30
Total per line	10	45
3 lines per modification	30	135
10 modifications	300	1350
<i>Inducible activity</i>		
Expression analysis	5	15
Functional analysis (5 conditions)	25	120
Total per line	30	135
3 lines per modification	90	405
10 modifications	900	4050
<i>Reporters</i>		
Expression analysis	5	15
Functional analysis:	5	30
Total per line	10	45
3 lines per modification	30	135
5 reporter lines	150	625
Somatic 'switch' gene introduction		
5 variables (e.g. dosage) + control	30	
25 applications	750	
Conditional alleles		
Recombination validation	5	30
2 lines per cond. allele	10	60
25 cond. alleles	250	1500
Total experimental:	2350	
Breeding		7525
Grand total:	9875	
Licensed in this application: 2350		

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.

- Generation and testing of a new 'tool box' and conditional lines is carefully considered in advance and should in principle yield new possibilities to study the effects of changes in gene activity in a complete animal.
- Before a new 'tool box' or conditional mouse line is created and tested we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already available 'tool box' strains and conditional strains of the same gene or locus. Duplicate mouse strains are not produced.
In addition we will search the literature and other resources for the most efficient technologies for induction and somatic delivery.
The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11):1755-85. doi: 10.1038).
- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background in which the subsequent experiments in this application (appendix 3 and 4) will be performed. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryos and ES cells from the relevant background.

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

- 1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.
- 2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia according to SOP will be applied

-during ear or tail clipping,

-injection either intra-muscular, intra-thoracic.

-introduction via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland

-tattoo of the skin

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical intra-cranial installation

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We don't expect to find more adverse effects during cross-breeding of 'tool box' and conditional modified strains in the context of their validation.

Explain why these effects may emerge.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than mild due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled

Indicate the likely incidence.

Based on our experience so far the likelihood of this happening is low (only a very small fraction (<1%) of 'tool box' or conditional mouse strains).

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').

None of the mice that have undergone one of the listed procedures will suffer discomfort at a level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small minority of the mice will be involved in this procedure (< 0,5%).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	Phenotyping of mice carrying germ line or temporal and/or tissue specific genetic modifications

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.

To study the effects of gene modification in all cells of the mouse we will set up cohorts of germ line modified mice and appropriate controls. First we will monitor viability and Mendelian transmission. In case the germ line modification is viable we will follow the modified mice over time and monitor development and behaviour. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In cases of families of genes that have similar molecular activities (redundancy) or sets of complementing genes we might need to combine modification of multiple genes in order to uncover their physiological function. If germ line modification is not viable we will first characterize the phenotype at different stages of gestation. For this we will set up breeding pairs to produce pregnant females carrying modified and control foetuses.

In case we want to study gene function at later stages and in specific tissues/cell types we will take the conditional approach and combine the necessary genetic components to generate the experimental and control cohorts of mice by efficient breeding strategies. These genetic components include conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various constitutive or inducible 'switch' genes (e.g. recombinases such as Cre, Flp) that activate the genetic modification in conditional genes.

Alternative approaches that introduce the 'switch' genes somatically will be involved as well. For example, the use of viral vectors carrying cell type specific promoters driving 'switch' gene expression. In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated thereby refining the read out of the experiments.

Decision on timing and tissue/cell type specificity will be primarily based on the tumor type in which the gene of interest was found to be implicated in addition to their expression profile and other data. After inducing the gene modifications we will follow the mice over time and monitor development and behaviour. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at on average 2 time points based on the expression and functional characteristics of the genetic modification of interest.

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

For the generation of the genetically modified and control cohorts breeding pairs will be set up in order to obtain the experimental mice with the appropriate genotype. For this the following procedures will be necessary:

- 1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification
 - a) toe clipping performed at 5-7 days after birth OR
 - b) ear clipping performed after weaning. This is done under anesthesia according to SOP. The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always all mice need to be genotyped shortly after birth.
 - c) tail clipping after weaning under anesthesia according to SOP (sometimes required to obtain sufficient DNA for careful assessment of the structure of transgene insertions).
 - 2) In case of inducible gene modification animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):
 - a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
 - b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
 - c) oral administration (maximally 5 times)
 - d) topical application on the skin under anesthesia according to SOP (maximally 3x).
 - 3) For somatic introduction of gene modifications, various formulations of 'switch' gene systems can be used e.g. viral vector suspensions, liposome suspensions and DNA, RNA and proteins formulated in various solvents. In case the introduction of these systems will raise an immune response against the cells that have been targeted (e.g. viral vectors generating foreign antigens) we will supplement the drinking water of the mice with immune suppressants. For somatic introduction of the conditional gene, mice will be subjected to either one of the following procedures:
 - a) injection either sub-cutaneous, intra-peritoneal, intra-muscular, intra-venous, intra-thoracic; if necessary under anesthesia according to SOP (1x)
 - b) introduction under anesthesia according to without surgery via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland (1x)
 - c) surgical intra-cranial installation under anesthesia and analgesia according to SOP (1x)
 - d) tattoo of the skin under anesthesia according to (maximally 3x)
 - e) shaving of the skin and topical application (ointment) (maximally 3x)
-
- Once the cohorts of mice carrying the relevant genetic modifications have been set up, either with or

without (somatic) induction, the following procedures will be performed:

4) Overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behavior, relative size, breeding parameters and clinical signs will all be assessed.

5) Animals are killed according to SOP; tissue/cells will be harvested and for subjected to the following procedures:

-molecular characterization directed at the following aspects:

- reporter allele expression
- presence of gene modification of interest

-histo-pathology,

-tissue culture derivation

In some cases depending on the expression and functional characteristics of the genetic modification of interest, the following additional procedures will be performed:

6) Blood sampling according to SOP at different time points after activation of the genetic modification to measure a wide range of relevant blood parameters.

7) Mice are injected with DNA labeling substances (e.g. BrdU) before short before sacrifice in order to detect proliferating cells by histo-chemistry

None of the listed procedures causes a discomfort level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small minority of the mice will be involved in this procedure (< 0,5%).

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

We expect to characterize 50 new lines carrying germ line modifications. Most of the modification will be homozygous. Controls for these experimental mice will be wild type littermates.

We expect to generate 5 compound modified mouse lines carrying modified redundant or complementing alleles. Generating the experimental mice will take significantly more mice in order to breed two modified alleles to homozygosity.

For 25 genes we expect to study their effects of conditional modification under, on average, 2 conditions

e.g. in a tissue specific and/or temporally controlled fashion. In these cases we will incorporate reporter alleles to trace the cells that have undergone the modification, which will need more mice for the generation of the experimental cohorts.

For 10 genes we expect to study their effects of conditional modification after somatic introduction of 'switch' genes. For these analyses we will also make use of reporter alleles to trace the cells that have undergone the modification. On average we expect to use 2 applications of 'switch' gene delivery. Cohorts of experimental mice in which multiple modified alleles are combined will be generated by cross breeding. This will involve a considerable number of mice.

However, according to the '*Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren*' (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice in this appendix are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

These numbers are based on a group size of 10 experimental and 10 control animals for all of these analyses as in our experience this number is sufficient to draw firm conclusions.

nr mice needed	experimental + controls	breeding	
<i>Germline modification</i>			
per line 1 time point	20	<i>24</i>	
3 time points	60	<i>72</i>	
2 lines each	120	<i>144</i>	
50 modified alleles	6000	<i>7200</i>	
<i>Compound germline modification</i>			
per compound modified line	20	<i>96</i>	
3 time points	60	<i>288</i>	
10 compound modified lines	600	<i>2880</i>	
<i>Conditional modification</i>			
per line + reporter	20	<i>48</i>	
2 time points	40	<i>96</i>	
2 'switch' alleles per line	80	<i>192</i>	
25 lines	2000	<i>4800</i>	
<i>Somatic 'switch' gene introduction</i>			
per line + reporter	20	<i>48</i>	
2 applications	40	<i>96</i>	
10 lines	400	<i>960</i>	
Total experimental	9000		
breeding		<i>15840</i>	
Grand total:	24840		
Licensed in this application:	9000		

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.

- Generation and characterization of a new lines carrying modification in cancer related genes is carefully considered in advance and should in principle yield functional information that can not be obtained by 'in vitro' studies but only in a complete animal.
- Before a new mouse line is created and phenotyped we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already existing data on the function of the same gene or locus. We will not duplicate the generation of mouse strains.
The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11):1755-85. doi: 10.1038).
- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background in which the experiments in this appendix will be performed. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryos and ES cells from the relevant background.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia with isoflurane will be applied

-during ear or tail clipping,

-injection either intra-muscular, intra-thoracic.

-introduction surgery via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland

-tattoo of the skin

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical intra-cranial installation

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The purpose of this appendix is to study phenotypic consequences of (conditional) gene modification in living mice. Since the physiological function of the genes of interest is not known and in fact the aim of these studies and we cannot exclude the occurrence of adverse effects in some of the generated (compound) modified mouse strains. However, based on our 30 years' experience in this type of studies we expect that less than of 10% of the animals the phenotype will be affected and half of these might suffer unexpected discomfort. The nature of the adverse effects and level of discomfort is unpredictable. Rarely, mice are born (the F0 founders) with elephant teeth or showing a severely retarded development, but this also occurs during normal breeding.

In all cases mentioned above the affected animals will be killed immediately in order to limit the discomfort level to moderate

Explain why these effects may emerge.

In addition to the developmental and physiological consequences of the gene modifications for the handlings of the embryo's or ES cells (e.g. micro-injection or modification per se of ES cells) during the modification procedure might perhaps cause improper development in exceptional cases that emerge in the F0 founders.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than moderate due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience and published data (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514) only a small fraction (<5%) of genetically modified mouse strains might have spontaneous discomfort higher than mild.

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').

None of the mice that have undergone one of the listed procedures will suffer discomfort at a level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small number of the mice will be involved in this procedure (< 1%).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'. 30100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 4 | Functional analysis of genetic modifications in mice under challenging 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.

For some genes the results of the analyses described in appendix 3 and existing data from other sources may indicate that their function can only be uncovered when the modified mice or tissues/cells derived from them are exposed to challenging conditions. This might be the case when they have a role in stem cell performance supporting tissue homeostasis and regeneration. Such a role could be very relevant for tumor maintenance and post-treatment relapses. This appendix 4 describes short term (pilot) experiments involving challenging conditions to obtain the leads for separate, additional licence applications that address on a broad scale and in greater depth the function of these genes.

The conditions we want to apply enable to test in a defined and reproducible fashion the ability of genetically modified tissues/cells to contribute to the restoration of damaged tissues. This approach is especially suited to address the role of genes in (tissue) stem cell function. The tissues in which we intend to perform these analyses include the skin, mammary gland, the hematopoietic system and the liver. The research in our institute has a strong focus on tumorigenesis in these tissues, which are also most suitable for the analysis of stem cell performance, since these tissues have an intrinsically high regeneration potential.

We will perform these analyses only for genes for which we have indications that they are involved in

tissue homeostasis and regeneration and the regular approach described in appendix 3 is not informative.

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

Two types of animal experiments will be carried out:

- 1) Experiments in which genetically modified animals undergo tissue damaging procedures and in which restoration of these tissues will be analysed at different time points directly.
- 2) Experiments in which recipient animals undergo tissue damaging procedures and subsequently serve as acceptors for tissues/cells transplantations from genetically modified mice. The performance of these grafts in the recipient mice will be analysed, e.g. their ability to tissue restoration, at different time points.

For the type 1 experiments, we will perform the following tissue damaging procedures in experimental mice directly:

- 1) total body irradiation according to SOP
- 2) targeted, local irradiation to damage specific tissues according to SOP
- 3) local exposure to chemical agents (e.g. naphtaline damaging lung tissue); the method of application is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the damaging agent
- 4) skin wounding under anaesthesia and analgesia according to SOP
- 5) partial mammary fat pad clearance under anaesthesia and analgesia according to SOP
- 6) partial hepatectomy under anaesthesia and analgesia according to SOP

In some cases using conditionally modified mice also carrying inducible 'switch' alleles the gene modification will be activated after the tissue damaging procedure. For this, animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):

- a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
- b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
- c) oral administration (maximally 5 times)
- d) topical application on the skin under isoflurane anesthesia (maximally 3x).

For the type 2 experiments, we will perform the following tissue damaging and transplantation procedures in recipient mice:

- 1) total body irradiation to deplete the hematopoietic system of the recipient mice followed by transplantation by intra-venous injection of bone marrow cell suspensions from genetically modified and control mice
- 2) surgical removal of small piece of the dorsal skin (wounding) of the recipient mice followed by transplantation skin tissue or skin cell suspensions from genetically modified and control mice under anaesthesia and analgesia in the wounded skin of recipient mice
- 3) mammary fat pad clearance of recipient mice and transfer of mammary gland tissue or mammary cell suspensions from genetically modified or control mice in cleared fat pads of recipient mice under anaesthesia and analgesia.

Transplanted tissues or cells may carry reporter alleles in order to accurately distinguish between

transplanted and host tissues/cells.

In some cases the gene modification in the donor tissue will may be activated after transplantation of tissues from conditionally modified mice carrying inducible 'switch' alleles. For this, after grafting the recipient animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):

- a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
- b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
- c) oral administration (maximally 5 times)
- d) topical application on the skin under isoflurane anesthesia (maximally 3x).

Once the cohorts of recipient mice carrying the relevant tissue damage have been set up, either with or without tissue/cell suspension transplantation, the following procedures will be performed:

-assessment of regeneration of the affected tissue by histopathology

-overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behavior, relative size and clinical signs will all be assessed.

-i.p. injection with DNA labeling substances (e.g. BrdU) before sacrifice in order to detect proliferating cells

-animals are killed according to SOP; tissue/cells will be harvested and for subjected to the following procedures:

- molecular characterization directed at the following aspects:
 - reporter allele expression
 - presence of gene modification of interest
- histo-pathology,
- tissue culture derivation

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

All mice will be enrolled as adult.

We expect to characterize the effects of 30 genetic modifications in type 1 experiments: 13 in mice after damaging by irradiation, 5 after tissue damaging by agents, 5 after skin wounding, 5 after partial mammary fat pad clearance and 2 after hepatectomy.

Per experiment we will use 10 experimental and 10 wild type control mice as in our experience these numbers are sufficient to draw significant conclusions.

In type 2 experiments we expect to analyze the transplants from 18 GM lines: 6 after bone marrow transplantation, 6 after skin/cell transplantation and 6 after mammary tissue/cell transplantation. For these transplantation experiments isogenic recipients will be used in order to immunologically match donor and recipient and to maximize the take rate of the transplants.

Per experiment we will use 10 recipients for transplantation of experimental tissue/cells and 10 recipients for transplantation of control tissue/cells as in our experience these numbers are sufficient to draw significant conclusions.

According to the 'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren' (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice involved in these experiments are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

nr mice needed	experimental + controls	<i>breeding</i>
<i>Type 1 experiment</i>		
per GM line 1 time point	20	<i>72</i>
3 time points	60	<i>216</i>
30 GM lines	1800	<i>6480</i>
<i>Type 2 experiment</i>		
per GM tissue/cell transplant	20	<i>96</i>
3 time points	60	<i>288</i>
transplants from 18 GM lines	1080	<i>5184</i>
Total experimental	2880	
breeding		<i>11664</i>
Grand total:	14544	
Licensed in this application:	2880	

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.

- The experiments to address the involvement of genes in stem cell performance and tissue regeneration using genetically modified mouse lines are carefully considered in advance and should in principle yield functional information that cannot be obtained by 'in vitro' studies but only in a complete animal. We will perform these experiments only for genes for which data from literature or our own results (e.g. from experiments described in appendix 3) strongly indicate a role in stem cell performance and tissue regeneration.
- All transplanted tissues or cells will carry reporter alleles in order to accurately distinguish between transplanted and host tissues/cells. This increases the sensitivity of the analyses and reduces the number of mice necessary for drawing sound conclusions
- In case of transplantation assays, if possible we will use recipient mice for both experimental and control transplant (e.g. skin transplantations on the left and right dorsal site). This improves the experimental setting and reduces the number of mice needed without increasing discomfort.
- The genetic modifications have been introduced in mice as much as possible in the desired genetic background in which the experiments in this appendix will be performed. This has been achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryo's and ES cells from the relevant background.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

x No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia according to SOP will be applied when animals are exposed to

-total body and targeted, local irradiation

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical removal of small piece of the dorsal skin

-mammary fat pad clearance

-hepatectomy

Analgesia according to SOP will be applied

-after application of tissue damaging agents

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Depending on the damaging treatment mice might suffer from anaemia, local pain and general malaise.

Explain why these effects may emerge.

Irradiation causes bone marrow failure leading to anaemia and malaise; other tissue damaging treatments might cause pain due to local inflammatory lesions.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up. In these cases mice will be taken out of the experiment when discomfort exceeds the level of moderate.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

We will use the criteria as described in the Code of Practice for cancer research.

Animals will be taken out of the experiment when discomfort exceeds the level of moderate

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of exceeding discomfort level of moderate depends on the treatment. For this incidence we estimate the following for the treatments we will use:

total body irradiation:	<50%
exposure to damaging agents:	<5%
hepatectomy	<20%
other treatments	<5%

K. Classification of severity of procedures

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

For all experimental mice we expect a discomfort level of moderate. The mice are monitored daily. Animals will be taken out of the experiment when discomfort exceeds the level of moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Postbus 90203

1006 BE AMSTERDAM



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
AVD301002017840

Bijlagen

2

Datum 23 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 januari 2017. Het gaat om uw project "Functional analysis of genes implicated in cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD301002017840. 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:

23 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD301002017840

Datum:
23 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017840

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 30100
Naam instelling of organisatie: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 40530817
Straat en huisnummer: Plesmanlaan 121
Postbus: 90203
Postcode en plaats: 1006 BE AMSTERDAM
IBAN: NL71DEUT0626343534
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
23 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017840

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 februari 2017
Geplande einddatum: 1 februari 2022
Titel project: Functional analysis of genes implicated in cancer
Titel niet-technische samenvatting: Functionale analyse van genen betrokken bij kanker
Naam DEC: NKI
Postadres DEC: t.a.v. [REDACTED] Postbus 90203;1006 BE; Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Amsterdam
Datum: 20 januari 2017

Datum:
23 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017840



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Nederlands Kanker Instituut
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 90203
1006 BE AMSTERDAM


**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
AVD301002017840
Bijlagen
2

Datum 23 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 januari 2017
Vervaldatum: 22 februari 2017
Factuurnummer: 170840
Ordernummer: Cost center 4050 / Project 16 006

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD301002017840	€ 1.684,00

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 Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Postbus 90203

1006 BE AMSTERDAM



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
AVD301002017840

Datum

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 20 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Functional analysis of genes implicated in cancer" met aanvraagnummer AVD301002017840. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 17 maart 2017 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. 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

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 15:02
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag AVD301002017840
Bijlagen: AanhoudenBeoordelenBrief_1.pdf

Geachte [REDACTED]

Bijgevoegde brief wordt u niet meer per post toegezonden.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op de vragen te antwoorden. Indien wij uiterlijk 15 februari de antwoorden binnen hebben, zal deze aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering besproken worden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

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

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Postbus 90203

1006 BE AMSTERDAM



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
AVD301002017840

Datum 7 februari 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 20 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Functional analysis of genes implicated in cancer" met aanvraagnummer AVD301002017840. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

In de NTS heeft u niets gezegd over het feit dat voor deze experimenten nieuwe muizen stammen worden gemaakt, waarbij ook een deel van de dieren niet gebruikt zal worden. Om een volledig beeld te geven van wat gebeurt in dit project verzoeken wij u dit toe te voegen.

Onduidelijkheden

- 1) Bij de criteria van humane eindpunten die u gebruikt schrijft u "when discomfort exceeds the level of moderate". Kunt u nader omschrijven hoe dit gedefiniëerd wordt.
- 2) Bij de verschillende bijlagen heeft u vraag L niet ingevuld. Graag dit alsnog doen.
- 3) Kunt u aangeven voor bijlagen 3.4.4.2, 3.4.4.3 en 3.4.4.4 of u dieren van beide geslachten zult gebruiken. Indien u enkel 1 geslacht gebruikt in deze bijlagen, kunt u dit dan onderbouwen?

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

Datum:
7 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017840

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. 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

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



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 Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD301002017840

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:

7 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD301002017840

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

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 15:09
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag AVD301002017840
Bijlagen: AanhoudenBeoordelenBrief_1.pdf

Geachte DEC,

Enige tijd geleden ontvingen wij een aanvraag waarover uw DEC een advies heeft uitgebracht. Het gaat om een aanvraag getiteld: Functional analysis of genes implicated in cancer met aanvraagnummer AVD301002017840. Wij hebben de aanvrager nog enkele vragen gesteld (zie bijgevoegde brief).

Indien u als DEC nog aanvullend wilt adviseren op deze vragen, kan dat.

Daarnaast willen wij u vragen op basis waarvan u adviseert om een beoordeling achteraf toe te voegen aan deze aanvraag. Doelt u hiermee op rapportage over de fokaantallen? Graag verheldering.

Wij willen u verzoeken om uiterlijk 15 februari te reageren op deze e-mail, zodat deze aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering kan worden besproken.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 10 februari 2017 15:46
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvraag AVD301002017840

Geachte [REDACTED]
Zoals vanochtend telefonisch besproken met [REDACTED], kunt u van de brief die ik op 7 februari per e-mail verstuurd heb, de vraag over de NTS negeren.
Deze vraag is niet van toepassing op uw aanvraag, voor zover ik dit nu kan beoordelen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 7 februari 2017 15:02
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag AVD301002017840

Geachte [REDACTED]
Bijgevoegde brief wordt u niet meer per post toegezonden.
In principe heeft u 14 dagen de tijd om op de vragen te antwoorden. Indien wij uiterlijk 15 februari de antwoorden binnen hebben, zal deze aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering besproken worden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 14 februari 2017 18:07
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Aanvraag AVD301002017840

Opvolgingsmarkering: Opvolgen
Markeringsstatus: Voltooid

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Graag attendeer ik u erop dat de DEC NKI haar reactie vanmiddag heeft geuploaded in het CCD-systeem

Mocht u nog vragen hebben, hoor ik dit graag.

Bij voorbaat veel dank.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

The Netherlands Cancer Institute | Plesmanlaan 121 | 1066 CX AMSTERDAM | www.nki.nl
Antoni van Leeuwenhoek | Plesmanlaan 121 | 1066 CX AMSTERDAM | www.avl.nl

Dit e-mailbericht is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde(n). Als dit bericht niet voor u bestemd is, wordt u vriendelijk verzocht dit aan de afzender te melden. Het Antoni van Leeuwenhoek (AVL) staat door de elektronische verzending van dit bericht niet in voor de juiste en volledige overbrenging van de inhoud, noch voor tijdige ontvangst daarvan. Voor informatie over het AVL raadpleegt u www.avl.nl

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: dinsdag 7 februari 2017 15:09
To: DEC
Subject: Aanvraag AVD301002017840

Geachte DEC,
Enige tijd geleden ontvingen wij een aanvraag waarover uw DEC een advies heeft uitgebracht. Het gaat om een aanvraag getiteld: Functional analysis of genes implicated in cancer met aanvraagnummer AVD301002017840. Wij hebben de aanvrager nog enkele vragen gesteld (zie bijgevoegde brief).

Indien u als DEC nog aanvullend wilt adviseren op deze vragen, kan dat.

Daarnaast willen wij u vragen op basis waarvan u adviseert om een beoordeling achteraf toe te voegen aan deze aanvraag. Doelt u hiermee op rapportage over de fokaantallen? Graag verheldering.

Wij willen u verzoeken om uiterlijk 15 februari te reageren op deze e-mail, zodat deze aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering kan worden besproken.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Dierexperimentencommissie NKI
 Plesmanlaan 121
 1066 CX AMSTERDAM



DEC advies aan CCD

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Functional analysis of genes implicated in cancer
3. Titel van de NTS: Functionele analyse van genen betrokken bij kanker
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC NKI
 - telefoonnummer contactpersoon: [redacted] bereikbaar op [redacted]
 - e-mailadres contactpersoon: [redacted]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 07-12-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 14-12-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 14-12-2016 t/m 11-01-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 11-01-2017
 - advies aan CCD: 20-01-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum: 14-12-2016
 - Plaats: NKI
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 5
 - Aanwezige (namens) aanvrager: [redacted]
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 14 december 2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:
 - De aanvrager is verzocht om in het projectvoorstel bij vraag 3.2 duidelijk aan te geven wat de interne samenhang van dit project is. *De tekst is aangepast.*
 - De aanvrager is verzocht om de passage over het maatschappelijk belang bij vraag 3.3 van het projectvoorstel te herschrijven. *De tekst is aangepast.*
 - De aanvrager is verzocht om in de handreiking van begin oktober 2016 zorgvuldig na te gaan of het nodig is om de dieren betrokken bij de verplichte welzijnsmonitoring van de

gegenereerde lijnen onderdeel te maken van dit project. *De aanvrager heeft de aanvraag op dit punt ongewijzigd gelaten. De DEC kan zich vinden in de gehanteerde interpretatie van de handreiking.*

- De aanvrager heeft tal van redactionele suggesties ontvangen. *De suggesties zijn waar nodig adequaat verwerkt in 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. Eén van de DEC-leden is betrokken bij deze projectaanvraag. Dit lid is uitgesloten van de besluitvorming over deze aanvraag.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

Het kankeronderzoek, zowel in tumormateriaal van patiënten als in proefdieren, resulteert in de identificatie van grote aantallen genen en genetische elementen die betrokken zijn bij tal van vormen van kanker. De stap die daarop volgt is fundamenteel onderzoek naar de functie van die genen in normale fysiologische omstandigheden. Dit project heeft betrekking op die stap. Er worden genetisch gemodificeerde muizenlijnen gegenereerd (onder een andere vergunning) of geïmporteerd, waarin de door de aanvrager geselecteerde genen veranderd tot expressie komen. Deze muizenlijnen worden in het kader van dit project gefenotypeerd en op basis van de resultaten wordt een besluit genomen over de vraag of verder onderzoek naar de rol van de betreffende genen bij ontstaan en verloop van kanker en naar gerichte therapeutische interventies gerechtvaardigd is. Dit project omvat tevens de welzijnsbewaking van nieuw tot stand gekomen genetisch gemodificeerde lijnen voor zover verwacht wordt dat daarbij sprake zal zijn van een aangetast fenotype. Op basis van ervaring weet de aanvrager dat dit bij maximaal 10% van de lijnen het geval zal zijn.

Dit onderzoek levert voor alle onderzochte genen de informatie op die nodig is om een "go/no go" beslissing te kunnen nemen over verder onderzoek en om beslissingen te kunnen nemen over het design van dat vervolgonderzoek (waarvoor dan een aparte vergunningaanvraag zal worden ingediend).

Aangezien verwacht mag worden dat in relatief veel gevallen dit onderzoek tot een "no go" leidt, of tot een aanzienlijke aanpassing van het vervolgonderzoek, is het naar de mening van de DEC gerechtvaardigd om al dit eenvoudige en routinematige preliminaire onderzoek naar de normale fysiologische rol van genen in één aanvraag op te nemen (horizontale benadering). Het indienen van een groot aantal verschillende projectaanvragen voor losse (groepen van) genen, waarin dan ook het vervolgonderzoek naar die genen is opgenomen (verticale benadering), zou er toe leiden

dat in veel projecten al in een vroeg stadium een “no go” beslissing genomen wordt. Ook zou het vervolgonderzoek in deze verticale projectaanvragen noodzakelijkerwijs nog in algemene termen beschreven moeten worden. Met de horizontale benadering wordt voorkomen dat er een groot aantal aanvragen ingediend wordt met in algemene termen beschreven vervolgonderzoek dat mogelijkerwijs uiteindelijk niet zal worden uitgevoerd.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het onderzoeken van de normale functie van genen waarvan gebleken is dat die ontregeld zijn bij kanker. Hiertoe worden modificaties in deze genen geïntroduceerd in muizen, of worden muizen met genetische modificaties geïmporteerd en gefokt, en worden vervolgens de gevolgen van die modificaties voor de normale ontwikkeling van deze muizen geanalyseerd. Deze kennis van de normale functie van de genen is onmisbaar om vast te kunnen stellen wat er fout gaat als die genen, door het feit dat ze ontregeld zijn, bijdragen aan het ontstaan van kanker. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg aanknopingspunten te vinden voor therapeutische interventies. Het verband tussen het directe doel en het uiteindelijke doel is weliswaar niet direct, het betreft immers fundamenteel onderzoek, maar wel reëel. Het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld, omdat er binnen dat veld consensus is over de waarde van deze aanpak.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat ze belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen verkrijgen en publiceren, hetgeen vaak de sleutel is tot het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Naar de mening van de DEC dient dat echter geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en levert informatie en kennis op die van belang is voor de voortgang van het onderzoek in dit veld.
Voor kankerpatiënten is dit onderzoek van belang, omdat het op termijn kan bijdragen aan een verbetering van de mogelijkheden om kanker te behandelen. Mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een gerichte behandeling en diagnostiek met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over een breed palet van mogelijke therapieën voor kanker, een ernstige aandoening die zich in een groot aantal vormen manifesteert, is ook van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is **geen** sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren vinden plaats conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt bij het grootste deel van de dieren (73%) bepaald door de weinig ingrijpende handelingen die nodig zijn om de dieren te genotypen en te fenotypen. In ca. 10% van de genetische gemodificeerde lijnen die worden onderzocht zal naar verwachting sprake zijn van licht tot maximaal matig ongerief als gevolg van die modificatie. Waar dat te voorzien is wordt, indien mogelijk, gebruik gemaakt van conditionele genetische modificaties. In gevallen waarin het onderzoek aanwijzingen oplevert dat bepaalde genen betrokken kunnen zijn bij weefselhomeostase kan het voor de initiële fenotypering noodzakelijk zijn om weefsels te beschadigen om zo te achterhalen of de betreffende genen een rol spelen bij het herstel. De DEC schat de ernst hiervan in als matig, mede op grond van het feit dat strikte humane eindpunten zullen worden gehanteerd die moeten voorkomen dat het ongerief zich verder ontwikkelt tot ernstig.
Het cumulatief ongerief voor de dieren is dus juist ingeschat als licht voor 73% van de dieren, matig voor 27% van de dieren.
12. Elke dierproef brengt instrumenteel gebruik van speciaal voor dat doel in gevangenschap gefokte dieren met zich mee, hetgeen op zich al opgevat kan worden als een aantasting van hun integriteit. Omdat dit voor elk project geldt, vermeldt de DEC hier alleen zaken die kenmerkend zijn voor dit specifieke project. De integriteit van de dieren wordt of is aangetast op het niveau van het genoom door het aanbrengen van genetische modificaties, waarna men op zoek gaat naar (vaak subtiele) fenotypische veranderingen die een aanwijzing geven over de normale functie van het gen waarvan de expressie gewijzigd is. Behoudens uitzonderingen, valt niet te

verwachten dat dit tot ingrijpende fenotypische veranderingen leidt. De commissie is daarom van mening dat er sprake is van een beperkte aantasting van de integriteit.

13. Normaal gesproken valt in het grootste deel van dit onderzoek niet te verwachten dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken, omdat de genetische modificatie ernstige gevolgen blijkt te hebben. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is lager dan 1% en is op basis van eerdere ervaringen ingeschat. In veel van die gevallen is de reden om het dier uit de proef te nemen niet gerelateerd aan het experiment of de genetische modificatie, maar algemeen van aard. In bijlage 4 zal naar verwachting wel een aanzienlijk deel van de dieren uit de proef genomen worden, omdat verwacht mag worden dat het ongerief anders hoger dan matig zal worden. De risico's en symptomen die gepaard gaan met de verschillende "challenges" in deze bijlage zijn echter in grote lijnen bekend, zodat adequate monitoring en tijdig ingrijpen mogelijk is. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten. De commissie is het eens met de inschattingen en met de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Meestal zijn de aanwijzingen dat bepaalde genen bij kanker betrokken zouden kunnen zijn afkomstig uit (ex vivo) onderzoek aan tumorweefsel van patiënten en proefdieren. Waar mogelijk wordt de functie van die genen (eerst) in vitro onderzocht. Uiteindelijk vergt echter het onderzoeken van de rol van een gen in de normale ontwikkeling een intact dier waarin de expressie van dat gen is veranderd. Het is niet mogelijk om de vraagstellingen van dit project volledig zonder proefdieren te beantwoorden.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijk aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De aanvrager heeft inzichtelijk gemaakt hoe en in welke mate dit onderzoek leidt tot fokoverschotten. Het betreft dieren die wel geboren worden in het kader van dit onderzoek, maar niet gebruikt worden in de experimenten (bijvoorbeeld omdat zij niet het juiste genotype hebben). Naar het oordeel van de DEC zijn deze fokoverschotten niet te vermijden.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren worden zo kort mogelijk in het experiment gehouden en er worden adequate humane eindpunten gehanteerd. Het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de genetische modificaties weefselspecifiek en tamoxifen-induceerbaar zijn voorkomt onnodig ongerief door ongecontroleerde tumorgroei. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het project betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project in de regel gebruik maken van zowel mannelijke, als vrouwelijke dieren, tenzij het onderzoek betreft naar genen die een rol spelen bij tumoren die geslachtsgebonden zijn.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels en organen na afloop te kunnen uitnemen voor verder onderzoek. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Voor alle dieren vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Doel van het project is het onderzoeken van de normale functie van genen waarvan gebleken is dat die ontregeld zijn bij kanker. Deze kennis van de normale functie van de genen is onmisbaar om vast te kunnen stellen wat er fout gaat als die genen, door het feit dat ze ontregeld zijn, bijdragen aan het ontstaan van kanker. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg aanknopingspunten te vinden voor therapeutische interventies. Er is dringend behoefte aan nieuwe therapeutische benaderingen voor kanker die in combinatie met andere therapieën kunnen worden ingezet om zo de kansen op genezing, of het onder controle houden van de ziekte, te vergroten. Op termijn is het onderzoek daarmee ook voor patiënten en voor de samenleving van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van de gezondheid en kwaliteit van leven van veel mensen. De DEC acht het doel van het onderzoek om deze redenen van groot belang.
3. De DEC is overtuigd van het grote belang van de doelstelling van dit project. De commissie is daarnaast overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek van de aanvrager. Dit onderzoek is ingebed in een gerenommeerd instituut dat over alle noodzakelijke voorzieningen beschikt. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste grote belang van de doelstelling de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van het onderzoek op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- o Op grond van het wettelijk vereiste (art. 10a1, lid 3) dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Met vriendelijke groet,



ambt. secretaris DEC/NKI


Dierexperimentencommissie NKI
Plesmanlaan 121
1066 CX AMSTERDAM



14 februari 2017

Betreft: Aanvraag AVD301002017840

Geachte CCD,

Het advies om deze vergunning te verlenen onder de voorwaarde dat er achteraf een beoordeling plaats dient te vinden, is afkomstig uit een concept-versie van het advies en ten onrechte in de definitieve versie blijven staan. In het eerste concept van het advies werd er van uit gegaan dat er bij een klein deel van de dieren in bijlage 4 kortdurend ernstig ongerief op zou kunnen treden. Tijdens de bespreking van de aanvraag door de voltallige DEC bleek dat de DEC-leden vonden dat bij een strikte toepassing van humane eindpunten geen ernstig ongerief zou hoeven optreden. De commissie heeft dit ook expliciet verwoord in haar advies (citaat C13): *'In bijlage 4 zal naar verwachting wel een aanzienlijk deel van de dieren uit de proef genomen worden, omdat verwacht mag worden dat het ongerief anders hoger dan matig zal worden. De risico's en symptomen die gepaard gaan met de verschillende "challenges" in deze bijlage zijn echter in grote lijnen bekend, zodat adequate monitoring en tijdig ingrijpen mogelijk is. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten'*.

De DEC doet u hierbij een herziene versie van het advies toekomen waaruit het advies om een voorwaarde op te nemen verwijderd is.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted] ambt. secretaris DEC/NKI
[Redacted]

DEC advies aan CCD

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Functional analysis of genes implicated in cancer
3. Titel van de NTS: Functionele analyse van genen betrokken bij kanker
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC NKI
 - telefoonnummer contactpersoon: M. van der Meulen bereikbaar op 020-512 1904
 - e-mailadres contactpersoon: DEC@nki.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 07-12-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 14-12-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 14-12-2016 t/m 11-01-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 11-01-2017
 - advies aan CCD: 20-01-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum: 14-12-2016
 - Plaats: NKI
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 5
 - Aanwezige (namens) aanvrager: [REDACTED]
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 14 december 2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:
 - De aanvrager is verzocht om in het projectvoorstel bij vraag 3.2 duidelijk aan te geven wat de interne samenhang van dit project is. *De tekst is aangepast.*
 - De aanvrager is verzocht om de passage over het maatschappelijk belang bij vraag 3.3 van het projectvoorstel te herschrijven. *De tekst is aangepast.*
 - De aanvrager is verzocht om in de handreiking van begin oktober 2016 zorgvuldig na te gaan of het nodig is om de dieren betrokken bij de verplichte welzijnsmonitoring van de

gegenereerde lijnen onderdeel te maken van dit project. *De aanvrager heeft de aanvraag op dit punt ongewijzigd gelaten. De DEC kan zich vinden in de gehanteerde interpretatie van de handreiking.*

- De aanvrager heeft tal van redactionele suggesties ontvangen. *De suggesties zijn waar nodig adequaat verwerkt in 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. Eén van de DEC-leden is betrokken bij deze projectaanvraag. Dit lid is uitgesloten van de besluitvorming over deze aanvraag.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

Het kankeronderzoek, zowel in tumormateriaal van patiënten als in proefdieren, resulteert in de identificatie van grote aantallen genen en genetische elementen die betrokken zijn bij tal van vormen van kanker. De stap die daarop volgt is fundamenteel onderzoek naar de functie van die genen in normale fysiologische omstandigheden. Dit project heeft betrekking op die stap. Er worden genetisch gemodificeerde muizenlijnen gegenereerd (onder een andere vergunning) of geïmporteerd, waarin de door de aanvrager geselecteerde genen veranderd tot expressie komen. Deze muizenlijnen worden in het kader van dit project gefenotypeerd en op basis van de resultaten wordt een besluit genomen over de vraag of verder onderzoek naar de rol van de betreffende genen bij ontstaan en verloop van kanker en naar gerichte therapeutische interventies gerechtvaardigd is. Dit project omvat tevens de welzijnsbewaking van nieuw tot stand gekomen genetisch gemodificeerde lijnen voor zover verwacht wordt dat daarbij sprake zal zijn van een aangetast fenotype. Op basis van ervaring weet de aanvrager dat dit bij maximaal 10% van de lijnen het geval zal zijn.

Dit onderzoek levert voor alle onderzochte genen de informatie op die nodig is om een "go/no go" beslissing te kunnen nemen over verder onderzoek en om beslissingen te kunnen nemen over het design van dat vervolgonderzoek (waarvoor dan een aparte vergunningaanvraag zal worden ingediend).

Aangezien verwacht mag worden dat in relatief veel gevallen dit onderzoek tot een "no go" leidt, of tot een aanzienlijke aanpassing van het vervolgonderzoek, is het naar de mening van de DEC gerechtvaardigd om al dit eenvoudige en routinematige preliminaire onderzoek naar de normale fysiologische rol van genen in één aanvraag op te nemen (horizontale benadering). Het indienen van een groot aantal verschillende projectaanvragen voor losse (groepen van) genen, waarin dan ook het vervolgonderzoek naar die genen is opgenomen (verticale benadering), zou er toe leiden

dat in veel projecten al in een vroeg stadium een “no go” beslissing genomen wordt. Ook zou het vervolgonderzoek in deze verticale projectaanvragen noodzakelijkerwijs nog in algemene termen beschreven moeten worden. Met de horizontale benadering wordt voorkomen dat er een groot aantal aanvragen ingediend wordt met in algemene termen beschreven vervolgonderzoek dat mogelijkerwijs uiteindelijk niet zal worden uitgevoerd.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het onderzoeken van de normale functie van genen waarvan gebleken is dat die ontregeld zijn bij kanker. Hiertoe worden modificaties in deze genen geïntroduceerd in muizen, of worden muizen met genetische modificaties geïmporteerd en gefokt, en worden vervolgens de gevolgen van die modificaties voor de normale ontwikkeling van deze muizen geanalyseerd. Deze kennis van de normale functie van de genen is onmisbaar om vast te kunnen stellen wat er fout gaat als die genen, door het feit dat ze ontregeld zijn, bijdragen aan het ontstaan van kanker. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg aanknopingspunten te vinden voor therapeutische interventies. Het verband tussen het directe doel en het uiteindelijke doel is weliswaar niet direct, het betreft immers fundamenteel onderzoek, maar wel reëel. Het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld, omdat er binnen dat veld consensus is over de waarde van deze aanpak.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat ze belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen verkrijgen en publiceren, hetgeen vaak de sleutel is tot het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Naar de mening van de DEC dient dat echter geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en levert informatie en kennis op die van belang is voor de voortgang van het onderzoek in dit veld.
Voor kankerpatiënten is dit onderzoek van belang, omdat het op termijn kan bijdragen aan een verbetering van de mogelijkheden om kanker te behandelen. Mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een gerichte behandeling en diagnostiek met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over een breed palet van mogelijke therapieën voor kanker, een ernstige aandoening die zich in een groot aantal vormen manifesteert, is ook van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is **geen** sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren vinden plaats conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt bij het grootste deel van de dieren (73%) bepaald door de weinig ingrijpende handelingen die nodig zijn om de dieren te genotypen en te fenotypen. In ca. 10% van de genetische gemodificeerde lijnen die worden onderzocht zal naar verwachting sprake zijn van licht tot maximaal matig ongerief als gevolg van die modificatie. Waar dat te voorzien is wordt, indien mogelijk, gebruik gemaakt van conditionele genetische modificaties. In gevallen waarin het onderzoek aanwijzingen oplevert dat bepaalde genen betrokken kunnen zijn bij weefselhomeostase kan het voor de initiële fenotypering noodzakelijk zijn om weefsels te beschadigen om zo te achterhalen of de betreffende genen een rol spelen bij het herstel. De DEC schat de ernst hiervan in als matig, mede op grond van het feit dat strikte humane eindpunten zullen worden gehanteerd die moeten voorkomen dat het ongerief zich verder ontwikkelt tot ernstig.
Het cumulatief ongerief voor de dieren is dus juist ingeschat als licht voor 73% van de dieren, matig voor 27% van de dieren.
12. Elke dierproef brengt instrumenteel gebruik van speciaal voor dat doel in gevangenschap gefokte dieren met zich mee, hetgeen op zich al opgevat kan worden als een aantasting van hun integriteit. Omdat dit voor elk project geldt, vermeldt de DEC hier alleen zaken die kenmerkend zijn voor dit specifieke project. De integriteit van de dieren wordt of is aangetast op het niveau van het genoom door het aanbrengen van genetische modificaties, waarna men op zoek gaat naar (vaak subtiele) fenotypische veranderingen die een aanwijzing geven over de normale functie van het gen waarvan de expressie gewijzigd is. Behoudens uitzonderingen, valt niet te

verwachten dat dit tot ingrijpende fenotypische veranderingen leidt. De commissie is daarom van mening dat er sprake is van een beperkte aantasting van de integriteit.

13. Normaal gesproken valt in het grootste deel van dit onderzoek niet te verwachten dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken, omdat de genetische modificatie ernstige gevolgen blijkt te hebben. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is lager dan 1% en is op basis van eerdere ervaringen ingeschat. In veel van die gevallen is de reden om het dier uit de proef te nemen niet gerelateerd aan het experiment of de genetische modificatie, maar algemeen van aard. In bijlage 4 zal naar verwachting wel een aanzienlijk deel van de dieren uit de proef genomen worden, omdat verwacht mag worden dat het ongerief anders hoger dan matig zal worden. De risico's en symptomen die gepaard gaan met de verschillende "challenges" in deze bijlage zijn echter in grote lijnen bekend, zodat adequate monitoring en tijdig ingrijpen mogelijk is. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten. De commissie is het eens met de inschattingen en met de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Meestal zijn de aanwijzingen dat bepaalde genen bij kanker betrokken zouden kunnen zijn afkomstig uit (ex vivo) onderzoek aan tumorweefsel van patiënten en proefdieren. Waar mogelijk wordt de functie van die genen (eerst) in vitro onderzocht. Uiteindelijk vergt echter het onderzoeken van de rol van een gen in de normale ontwikkeling een intact dier waarin de expressie van dat gen is veranderd. Het is niet mogelijk om de vraagstellingen van dit project volledig zonder proefdieren te beantwoorden.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijk aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De aanvrager heeft inzichtelijk gemaakt hoe en in welke mate dit onderzoek leidt tot fokoverschotten. Het betreft dieren die wel geboren worden in het kader van dit onderzoek, maar niet gebruikt worden in de experimenten (bijvoorbeeld omdat zij niet het juiste genotype hebben). Naar het oordeel van de DEC zijn deze fokoverschotten niet te vermijden.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren worden zo kort mogelijk in het experiment gehouden en er worden adequate humane eindpunten gehanteerd. Het gebruik van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de genetische modificaties weefselspecifiek en tamoxifen-induceerbaar zijn voorkomt onnodig ongerief door ongecontroleerde tumorgroei. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het project betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project in de regel gebruik maken van zowel mannelijke, als vrouwelijke dieren, tenzij het onderzoek betreft naar genen die een rol spelen bij tumoren die geslachtsgebonden zijn.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels en organen na afloop te kunnen uitnemen voor verder onderzoek. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Voor alle dieren vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Doel van het project is het onderzoeken van de normale functie van genen waarvan gebleken is dat die ontregeld zijn bij kanker. Deze kennis van de normale functie van de genen is onmisbaar om vast te kunnen stellen wat er fout gaat als die genen, door het feit dat ze ontregeld zijn, bijdragen aan het ontstaan van kanker. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg aanknopingspunten te vinden voor therapeutische interventies. Er is dringend behoefte aan nieuwe therapeutische benaderingen voor kanker die in combinatie met andere therapieën kunnen worden ingezet om zo de kansen op genezing, of het onder controle houden van de ziekte, te vergroten. Op termijn is het onderzoek daarmee ook voor patiënten en voor de samenleving van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van de gezondheid en kwaliteit van leven van veel mensen. De DEC acht het doel van het onderzoek om deze redenen van groot belang.
3. De DEC is overtuigd van het grote belang van de doelstelling van dit project. De commissie is daarnaast overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek van de aanvrager. Dit onderzoek is ingebed in een gerenommeerd instituut dat over alle noodzakelijke voorzieningen beschikt. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste grote belang van de doelstelling de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van het onderzoek op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste (art. 10a1, lid 3) dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

[Redacted name]
ambt. secretaris DEC/NKI

[Redacted contact information]

Dierexperimentencommissie NKI
Plesmanlaan 121
1066 CX AMSTERDAM



14 februari 2017

Betreft: Aanvraag AVD301002017840

Geachte CCD,

Hierbij de aangepaste stukken met betrekking tot aanvraag AVD301002017840.

-In de NTS is nu aangegeven dat indien mogelijk dieren van andere instellingen betrokken worden. Wanneer niet dan zal ons eigen instituut deze dieren genereren onder een separate CCD vergunning.

-De humane eindpunten zijn in iedere appendix nader omschreven.

-Vraag L is in iedere appendix ingevuld.

-In iedere appendix is aangegeven dat in het algemeen beide geslachten gebruikt zullen worden, maar dat hiervan afgeweken kan worden om specifiek relevante redenen zoals bijvoorbeeld vrouwelijke dieren in geval van borsttumoronderzoek.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



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.

Cancer is caused by malfunctioning of genes regulating cellular processes e.g. cell division, differentiation

and migration. Normally these processes are properly controlled by adequate integration of gene activities in a complex network of signalling pathways. Changes in activity of these genes by mutation, under- or overexpression can result in an imbalanced pathway network leading to aberrant cell behaviour, e.g. uncontrolled proliferation, mobility, and ultimately to cancer. Notably, in tumors of distinct origin often the same pathways are affected by changes in different genes functional in these pathways.

Cancer research over the last decades comprised detailed genomic analyses of tumors from patients and animal models and large numbers of 'in vitro' and 'in vivo' screening approaches. This research has resulted in the identification of a large number of genes and genetic elements controlling them implicated in many different cancer types. However, since genomic analyses often occur at end stage tumor material the identification of these genes as such provides an essential but limited contribution to our understanding how they are involved in the tumorigenic process. For this, thorough functional study of these genes and genetic elements involving both 'in vitro' and 'in vivo' (animal) experiments in normal and oncogenic conditions is required. This yields fundamental knowledge necessary for understanding their possible role in tumor onset, development and progression, which is crucial for translational application in diagnostics and development of therapeutic intervention modalities.

The list of identified cancer genes to date is far from complete and with the still exponential growing potential of genome sequencing, screening and tagging technologies many new genes implicated in cancer development will be identified in the years to come. In this project we will select candidate genes and genetic elements on the basis of published data, e.g. cancer genomic databases from human and other species, and of data from in vitro and in vivo screening and tagging experiments. We want to acquire fundamental knowledge about the normal physiological function of (combination of) these genes and genetic elements by studying the phenotypic effects of controlled (expression) modification at the level of whole animals and at the cellular level, i.e. in GGO mice and cell cultures derived from them, respectively. This will be done in mice carrying the genetic modification in all cells (germ line modifications) or in mice in which the genetic modification is introduced in a tissue and/or temporal specific fashion (conditional modifications). In the latter situation we will also make use of reporter systems that enable to follow the modified cells in the course of development. Already available mouse strains carrying alleles with appropriate modifications will be imported. New strains will be generated in our institute under a separate license.

In general, the functional characterization of selected genes will initially entail the following aspects: viability of germ line modification, Mendelian transmission of the modification, phenotyping of the modified mice, comparison of their behaviour with wild type control mice and thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In addition, we will derive cell cultures from modified mice to study the effects of the changed gene expression at the molecular and cellular level. The results of these analyses will be leading in the choice from which tissues from the modified mice cell cultures will be derived.

In case germ line modification of selected genes is not viable or certain strong phenotypes preclude the detailed analysis of other, more subtle phenotypes, we will make use of conditional technology enabling temporal and tissue specific gene modification. Examples of early embryo lethality of germ line knockout alleles (see references), which show clear (cancer) phenotypes when alleles are inactivated at adulthood and/or in specific tissues unnoticed in studies of embryo development: pRb, PTEN, APC, Brca1 and BRCA2 (see references below).

References

- Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, te Riele H. Nature 1992, 359: 328-330, Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development.
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Nat Genet. 1998,19: 348-355, Pten is essential for embryonic development and tumour suppression.
- Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, Kobayashi M, Itakura C, Taketo M. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 9;92: 4482-4486, Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene.
- Hakem R, de la Pompa JL, Mak TW. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1998 3:431-445, Developmental studies of Brca1 and Brca2 knock-out mice.

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 objective of this project is to acquire fundamental knowledge about the normal, physiological function and their role in cellular signaling pathways of specific genes of which the activity is frequently deregulated in cancer development. This knowledge is essential to understand how this deregulation could affect the cross talk with other genetic lesions leading to tumorigenesis. Furthermore, these studies are necessary to predict the consequences of eventual therapeutic intervention strategies specifically targeting the activity of these genes. Moreover, this knowledge will provide essential leads for subsequent research projects for which eventually separate CCD license applications will be assembled. Under this project we will analyze the role of these genes selected on the basis of their data based relevance for tumor development, each in a separate study. In all these gene specific studies we will follow the same routine procedures: phenotyping of the modified mice, thorough histo-pathological and molecular analyses at different ages and characterization of cell cultures derived from these mice. The results of these studies together with existing data will be leading in designing subsequent 'in vivo' experiments addressing the oncogenic effects of (combinations of) deregulated genes thereby validating their role in human cancers and providing (animal) models for testing therapeutic intervention modalities. These subsequent experiments will be described in additional license applications. We think we can achieve this objective since our institute holds both the scientific knowledge and technological expertise for these studies: a modern state of the art animal facility including internationally recognized transgenic and imaging facilities embedded in the NWO Roadmap funded MCCA, a well trained staff taking care of animal husbandry, a dedicated animal pathology department with two mouse pathologists supported by a well-equipped pathology lab with all histological technologies available. In addition, all research departments within our institute have access to cell culture facilities, sophisticated digital microscopy (confocal, live-imaging, etc.) and flow cytometry facilities.

3.3 Relevance

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

Scientific: To understand the role of genes identified in large genomic and screening/tagging approaches in the process of cancer onset and progression it is essential to know what the functional role of these genes is in normal development and physiology. This knowledge is also crucial to set up therapeutic

intervention strategies targeting the cellular pathways in which these genes are active.

Social: Cancer has a major negative impact on health / wellbeing of many people. Moreover, the morbidity also has considerable negative economic consequences. There is an urgent need to improve existing treatment strategies since many of them have serious side effects, which limit their full application, since they are often based on targeting (generic) cellular processes also essential for normal healthy cells. Cancer research over the last decades has resulted in the identification of many genes causally implicated in cancer development, thereby providing many possible specific targets for new therapy modalities. The knowledge of the normal function of these genes is essential for the development of targeted therapeutic intervention strategies in evaluating their effectiveness and serious adverse effects. As an illustration of the relevance of these studies see below a short list of publications describing the phenotype of mice carrying modifications in cancer implicated genes and the possible adverse effects as a consequence of therapeutic intervention targeting their activity.

-Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J, Berns A. 2004, *Mol Cell Biol.* 24: 6104-6115, Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors.

-An N, Kraft AS, Kang Y. 2013, *J Hematol Oncol.* 6:12, Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice.

-Zhang HW, Ding J, Jin JL, Guo J, Liu JN, Karaplis A, Goltzman D, Miao D. 2010, *J Bone Miner Res.* 25: 640-652. Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice.

-Gu M, Shen L, Bai L, Gao J, Marshall C, Wu T, Ding J, Miao D, Xiao M. 2014, *Age* 36: 129-139. Heterozygous knockout of the Bmi-1 gene causes an early onset of phenotypes associated with brain aging.

3.4 Research strategy

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

In this project we want to characterize the normal function of cancer related genes in development and physiology at the level of a complete animal. As such the project comprises of many different smaller studies each focusing on a specific gene, gene family or element or set of complementing genes. These studies share the relationship with and relevance for cancer and in practice they follow the same course of straightforward experiments. For a schematic overview of the route each study will follow see flow chart.

Each study starts with the selection of a particular cancer related gene on the basis of existing data indicating their relevance for (human) cancer. For each gene project the following steps will be carried out:

- First we will search literature and depositories for already available mouse strains carrying the gene modification of interest. If available at other laboratories or depositories we will import these mice, if not we will generate the mouse strains in the MCCA facility in our institute and perform the welfare assessment of newly generated GM mice according to the European guidelines. The procedures to generate GM themselves are described in a separate license application from our institute (*'Generation and cryopreservation of genetically modified mouse strains'*).

According to the *'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren'* (Versie: oktober 2016), the welfare assessment of newly

generated genetically modified mouse strains does not require a CCD license upfront, but a license is required for newly genetically modified mouse lines when they exhibit an affected phenotype in their welfare assessment. Beforehand we cannot predict whether the modification of cancer related genes selected for further investigation will lead to an affected phenotype. However, we estimate that up to 10% of the newly generated modified mouse lines might exhibit an affected phenotype and we only apply for a CCD license for this number of mice (appendix 1). The estimation of 10% is based on our own experience and on published data from large phenotyping consortia (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514, High-throughput discovery of novel developmental phenotypes).

- In case germ line modifications preclude the analysis of subtle or cell type specific functions at later stages, e.g. in case of embryonic lethality, we will introduce the gene modifications in a temporally controlled and/or tissue/cell type specific fashion. For this we will make use of conditional targeting technology. This approach requires the generation of conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various 'switch' genes enabling controlled activation of gene modifications. Alternatively, 'switch' genes may be introduced somatically (e.g. using viral vectors). These 'switch' genes include sequence specific recombinases (e.g. Cre and Flp) or gene editing systems (e.g. Crispr/Cas). In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated, thereby refining the read out of the experiments. Mouse strains carrying 'switch' alleles and reporter alleles will be referred to as 'tool box' strains. Mouse strains involved in these analyses, i.e. those carrying conditional alleles for the genes of interest, and the 'tool box' strains will either be imported or generated in our transgenic facility. In the latter case, experiments validating their effectiveness will be executed. Validation of these strains and additional technology enabling conditional modification will be described in appendix 2.
- To study the effects of gene modification in all cells of the mouse we will set up cohorts of germ line modified mice and appropriate controls. First we will monitor viability and Mendelian transmission. In case the germ line modification is viable we will follow the modified mice over time and score for aberrant development and behavior. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In cases of genes that have similar (redundancy, e.g. gene families) or complementary molecular activities we might need to combine modification of gene family members or complementing genes in order to uncover their physiological function. If germ line modification is not viable we will first characterize the phenotype at different stages of gestation. For this we will set up breeding pairs to produce pregnant females carrying modified and control foetuses. In case we want to study gene function at later stages and in specific tissues/cell types we will take the conditional approach and we combine the necessary genetic components to generate the experimental and control cohorts of mice. Decision on timing and tissue/cell type specificity will also be based on the tumor type in which the gene of interest was found to be implicated in addition to their expression profile and other data. After inducing the gene modifications mice will be followed over time and scored for aberrant development and behavior. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis. In addition to these analyses we will derive cell cultures from modified mice to study the effects of the genetic modification on a cellular and molecular level under strictly defined conditions.
All these phenotyping and molecular characterization experiments will be described in appendix 3.
- The phenotypic analysis described in appendix 3 will be done on mice kept under standard conditions, not treated in any way. However, existing data from other sources and the results of the analyses described in appendix 3 may indicate that for some genes their function can only be uncovered when

the modified mice or tissues/cells derived from them are exposed to challenging conditions. This might especially be the case when they have a role in stem cell performance supporting tissue homeostasis and regeneration, which as such is also relevant for tumor maintenance. Appendix 4 describes short term pilot experiments involving challenging conditions to obtain the leads for separate, additional license applications that address on a broad scale and in greater depth the function of these genes under specific conditions.

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 procedures for the generation of genetically modified mouse strains are covered by a separate protocol from the transgenic facility of our institute. Appendix 1 describes the initial welfare assessment of newly generated mouse strains.

The required modifications and technology for conditional induction of genetic modifications will be validated as described in appendix 2 before setting up cohorts for phenotypic characterization of mouse strains carrying modified cancer related genes.

This phenotypic analysis is described in appendix 3 and requires the set up of experimental and control cohorts by conventional breeding procedures. When mice carry conditional modifications, mice will undergo treatments activating the genetic modification of interest. Mice will be closely monitored over time. At increasing ages mice will be sacrificed and total necropsy will be performed. All tissues will be carefully analyzed by molecular and histo-pathological assays. For 'vitro' studies we will also derive cell cultures from the genetically modified mouse strains.

In a minority of cases genetically modified mice or tissues/cells derived from them will be studied in vivo under challenging conditions as described in appendix 4. These experiments address the role of genes primarily involved in tissue regeneration and include transplantation procedures.

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

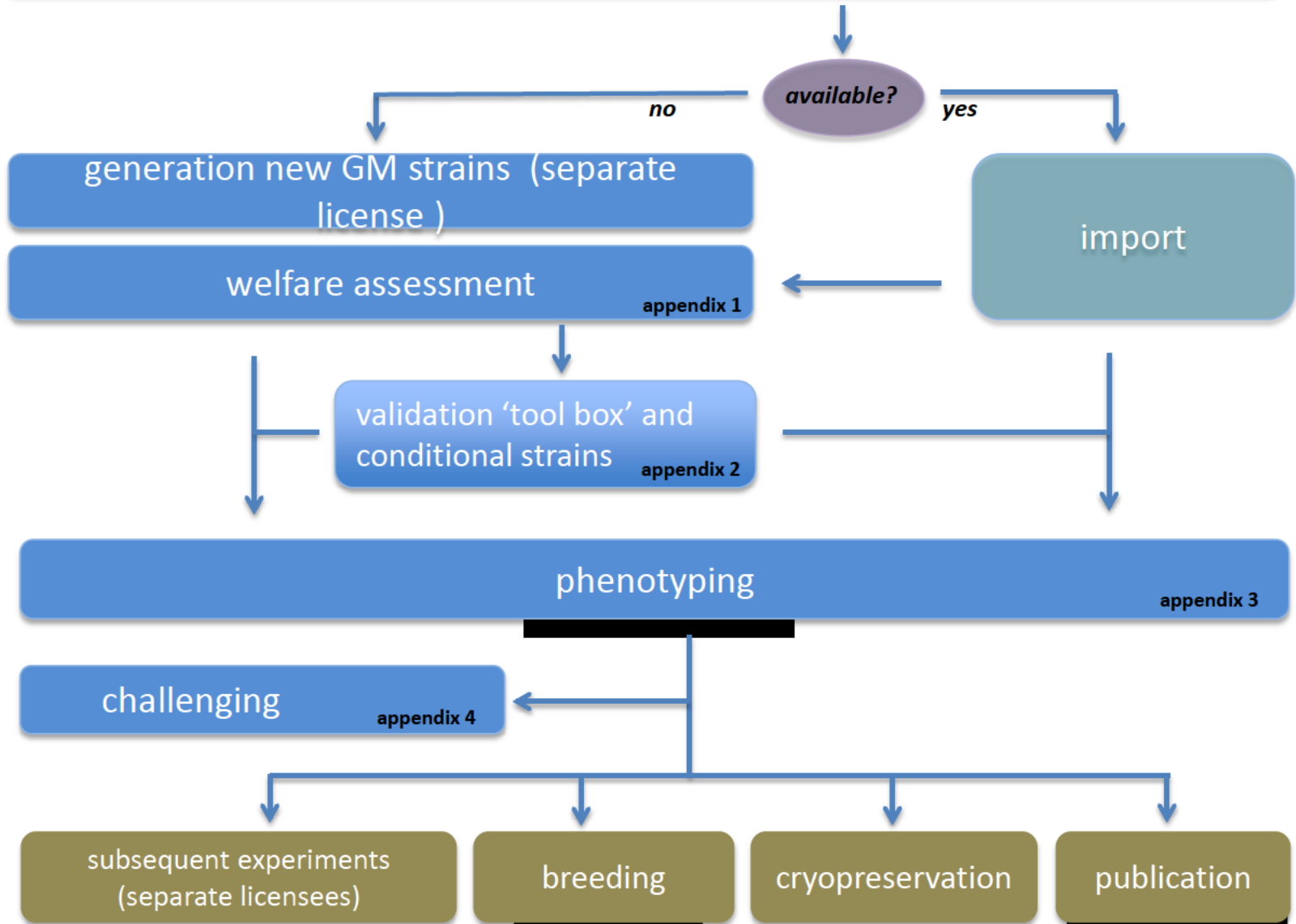
The flow chart presents an overview of how the project is organized. The coherence of the project is reflected by the fact that each study will take the same approach and consists of a preparation phase and an analytical phase in which the same experimental procedures are followed. In the preparation phase for each study the mouse strains carrying the genetic modification of interest are acquired, their welfare assessed and validated in case of 'tool box' strains (appendices 1 and 2). The analytical phase (appendix 3 and 4) for each separate study follows the same procedure: setting up appropriate cohorts, activation of the modifications if needed, phenotyping at different ages/stages, thorough molecular and histo-pathological characterization and cell culture derivation for ex vivo experiments (appendix 3). In a limited number of these studies the analysis phase will include the characterization of modified mice under challenging conditions (appendix 4). In the analytical phase also cell cultures will be derived from the genetically modified mice.

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	Welfare assessment of new genetically modified mice
2	Validation of conditional genetic modification technology
3	Phenotyping of mice carrying germ line or temporal and/or tissue specific genetic modifications
4	Functional analysis of genetic modifications in mice under challenging conditions

5	
6	
7	
8	
9	
10	

Selection cancer implicated genes to be phenotyped:
-literature, open data bases, etc
-own data: screening, tagging, etc





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'. 30100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | General welfare assessment of newly generated genetically modified (GM) mice |

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.

Creation of genetically modified (GM) mice will take place via 1) classic transgenesis with DNA injection into zygotes, 2) genome editing technologies (e.g. CRISPR/Cas) in pre-implantation embryo's or 3) injection of genetically modified embryonic stem cells into blastocysts. These procedures will be performed under a separate protocol from our transgenics facility. Basic welfare assessment for the novel (compound) mouse models, for 2 breeding cycles from F2 onwards, is performed according to the guidelines of the new EU directive. Some combination lines will be obtained by conventional crossing of generated lines. New combination lines will be screened for two generations and monitored for spontaneous phenotypic abnormalities.

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

1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification:

a. Toe clipping is performed at 5-7 days after birth OR

b. Ear clipping is performed after weaning. In order to improve the precision of the earmarks this is done under anesthesia according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always

all mice need to be genotyped shortly after birth.

In rare cases genotyping has to be repeated using an additional biopsy; this will be done by tail clipping under anesthesia according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

2) Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

3) Animals are killed according to SOP ('euthanasia of mice') from the animals facility for instance because they do not have the right genotype or display unacceptable suffering.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

Gender: Both male and female mice will be used, although in some case one gender will generally be selected for gender specific reasons (e.g. to follow mammary gland development).

Numbers: Based on our experience of the last 5 years, for the creation of a new GM mouse line we use on average up to 150 mice (according to the "Besluit Biotechnologie"). However, as the generation of the genetically modified strains per se will be performed under a different protocol from our transgenics facility (MCCA), we do not include these numbers in this current protocol.

The founder generations (F0) obtained from the transgenics facility consist on average of 30 animals per GM line.

For each germ line modification typically three independent founders are selected and initially bred to wild-type (e.g. FVB or B6) mice to create an F1. We will aim to generate substantial numbers of homozygous mice in the next generation (F2). Generations F2 to F4 will undergo an initial welfare assessment. The F4 is included in order to assess the full reproductive cycle over two generations, including gestation in homozygous parents (which does not usually apply to the F2). To have at least 7 males and 7 females for welfare assessment of each generation, we assume at least three litters (average size 7 pups) per generation will need to be generated. Assuming 30 mice for the F0, 30 for the F1 and F2 (to obtain sufficient numbers of male and female homozygous F2 mice), this yields $30 + 3 \times 10 + 3 \times 21 + 3 \times 21 = 222$ mice per genetic modification. Based on our experience from the last decade we expect to generate 50 germ line modified mouse lines for which we will need $50 \times 222 = 11100$ mice for welfare assessment.

For each conditional modification typically 2 independent founders will be selected. For welfare assessment we will need $30 + 2 \times 10 + 2 \times 10 + 2 \times 21 + 2 \times 21 = 154$ mice per modification. Based on our

experience from the last decade we expect to generate 25 conditionally modified mouse lines for which we will need $25 \times 154 = 3850$ mice for welfare assessment.

For each modified mouse line instrumental in the activation and/or tracing of conditional genetic modifications ('tool box' mouse lines) 3 independent founders will be selected. For welfare assessment we will need $30 + 3 \times 10 + 3 \times 10 + 3 \times 21 + 3 \times 21 = 222$ mice per modification. Based on our experience from the last decade we expect to generate 25 mouse lines instrumental in conditional genetic modification for which we will need $25 \times 222 = 5550$ mice for welfare assessment. In total we will need 20500 ($11100 + 3850 + 5550$) mice for the welfare assessment of 100 new genetically modified mouse lines. However, only for the lines that show an affected phenotype a CCD license is required. We cannot foresee of which lines the phenotype will be affected but we estimate that of up to 10% of the lines this might be the case. This figure is based on our own experience and published data from large phenotyping consortia (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514, High-throughput discovery of novel developmental phenotypes). Therefore, we need $0,10 \times 20500 = 2050$ mice licensed in this appendix.

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.

- Generation of a new (compound) GM line is carefully considered in advance and should in principle yield new information that can only be obtained by studying the effects of the change of gene activity in a complete animal. In addition, the precise genetic modification should be backed up by solid data and evidence, which can be obtained from a variety of sources, such as genetic screens, in vitro experiments or clinical (large-scale) patient data.
- Before a new GM mouse line is created, we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already available GM strains of the same gene or locus. Duplicate mouse strains are not produced.
- The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11): 1755-85. doi: 10.1038).
- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryo's and ES cells from the relevant background. As a result the differences in genetic background of the experimental mice and control mice will be as small as possible thereby increasing the significance and reproducibility of the welfare assessment data.

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

on the environment.

- 1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.
- 2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when signs of distress are observed.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia will be applied during ear or tail clipping according to SOP ('pain relief and anesthesia') from the Animal Facility.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The purpose of this appendix is to assess the welfare of mice carrying (conditional) modification in genes

of unknown function. We cannot exclude the occurrence of adverse effects in some of the generated (compound) modified mouse strains. However, based on our 30 years' experience in this type of studies we expect that less than of 10% of the animals the phenotype will be affected and half of these might suffer unexpected discomfort. The nature of the adverse effects and level of discomfort is unpredictable. Rarely, mice are born (the F0 founders) with elephant teeth or showing a severely retarded development, but this also occurs during normal breeding.

In all cases mentioned above the affected animals will be killed immediately in order to limit the discomfort level to moderate.

Explain why these effects may emerge.

In addition to the developmental and physiological consequences of the gene modifications for the handlings of the embryo's or ES cells (e.g. micro-injection or modification per se of ES cells) during the modification procedure might perhaps cause improper development in exceptional cases that emerge in the F0 founders.

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

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

When discomfort reaches the level of moderate, mice will be euthanized.

Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than moderate due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled.

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577).

In our experiments the most important endpoints that apply are:

-A rapid weight loss of more than 20% of the initial body weight, in case of adult animals. In case of juvenile animals, tailored rules will apply.

-Any sign of tumor formation

-Superficial measurable lesions (by caliper) and/or skin ulceration/necrosis.

-Any abnormal breathing or sign of circulatory problems.

-Any abnormal behavior or locomotion.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience and published data (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514) only a small fraction (<5%) of genetically modified mouse strains might have spontaneous discomfort higher than mild.

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').

- GM mice, during welfare assessment: mild (or less) 95%, moderate: <5%
- Mice undergoing ear or tail clips: mild

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.

The condition of the animals at the end of the experiment will require that the animal is humanely killed.

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.

x Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Validation of conditional genetic modification technology

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In case germ line modifications preclude the analysis of subtle or cell type specific functions at later stages, e.g. in case of embryonic lethality, we will introduce the gene modifications in a temporally controlled and/or tissue/cell specific fashion. For this we will make use of conditional technology. This approach requires the generation of conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various constitutive or inducible 'switch' genes (e.g. recombinases such as Cre, Flp) that activate the genetic modification in conditional genes. Alternative approaches that introduce the 'switch' genes somatically will be involved as well. For example, the use of viral vectors carrying cell type specific promoters driving 'switch' gene expression. In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated thereby refining the read out of the experiments.

Mouse strains carrying 'switch' gene alleles and reporter alleles will be referred to as 'tool box' strains. The functionality of these 'tool box' strains needs to be validated as well as functionality of the conditional modified mouse strains. Conditional genetic modifications should not lead to any phenotype but should serve efficiently as a substrate for 'switch' genes. Validation of these mouse strains and of alternative routes for 'switch' gene introduction will be described in this appendix 2.

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

For the validation of each 'tool box' strain, conditional strain or application to introduce 'switch' gene systems breeding pairs will be set up in order to obtain the experimental mice with the appropriate genotype. New 'switch' gene alleles will be combined with a validated reporter allele and new reporter alleles and new conditional alleles with a validated 'switch' gene allele. The validation experiments in case of somatic introduction of 'switch' gene systems will be directly done on validated reporter mice. Once the mice with the proper genotypes are available, the following procedures will be performed.

- 1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification
 - a) toe clipping is performed at 5-7 days after birth OR
 - b) ear clipping is performed after weaning. This is done under anaesthesia according to SOP. The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always all mice need to be genotyped shortly after birth.
 - c) tail clipping after weaning under anaesthesia according to SOP (sometimes required to obtain sufficient DNA for careful assessment of the structure of transgene insertions).
- 2) Overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behaviour, relative size, breeding parameters and clinical signs will all be assessed.
- 3) Generation of experimental cohorts in which the necessary genetic elements are combined (e.g. 'switch' gene alleles and reporter alleles).
- 4) Animals are euthanized according to SOP; tissue/cells will be subjected to further molecular and histological characterization directed at the following aspects:
 - expression level and tissue/cell type specificity of 'switch' gene alleles
 - functionality of 'switch' genes using validated reporter alleles as substrates
 - inducibility of 'switch' genes using validated reporter alleles
 - functionality of somatic delivery of switch genes using validated reporter alleles
 - functionality of reporter alleles using validated 'switch' gene alleles
 - functionality of conditional alleles
- 5) In case of inducible gene modification animals will be exposed to the appropriate inducing agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):
 - a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
 - b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
 - c) oral administration (maximally 5 times)
 - d) topical application on the skin under anaesthesia according to SOP (maximally 3x)
- 6) For somatic introduction of gene modifications, various formulations of 'switch' gene systems can be used e.g. viral vector suspensions, liposome suspensions and DNA, RNA and proteins formulated in various solvents. In case the introduction of these systems will raise an immune response against the cells that have been targeted (e.g. viral vectors generating foreign antigens) we will supplement the drinking water of the mice with immune suppressants. For somatic introduction of the 'switch' gene systems, mice will be subjected to either one of the following procedures:
 - a) injection either sub-cutaneous, intra-peritoneal, intra-muscular, intra-venous, intra-thoracic; if necessary under anaesthesia according to SOP (1x)
 - b) introduction under anaesthesia according to SOP without surgery via either one of the openings in the

- body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland (1x)
c) surgical intra-cranial installation under anaesthesia and analgesia according to SOP (1x)
d) tattoo of the skin under anaesthesia according to SOP (maximally 3x).
e) shaving of the skin and topical application (ointment) (maximally 3x)
7) Blood sampling according to SOP at different time points after activation of the genetic modification.

None of the listed procedures causes a discomfort level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation. Only a very small number of mice will be involved in this procedure (< 0,5%)

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behaviour and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. The institute is a license holder with NVWA.

Gender: Both male and female mice will be used, although in some case one gender will be preferred for gender specific reasons (e.g. to validate mammary gland specific expression).

We expect to functionally validate 25 new 'tool box' strains (10 carrying constitutive active 'switch' gene alleles, 10 inducible active 'switch' gene alleles and 5 new reporter alleles) and 25 new conditional alleles. In addition, based on the experiments during the last 5 years during which a broad range of conditional technologies has been applied, we fore see to analyse the effectiveness of 25 new strategies to somatically introduce 'switch' gene systems.

For functional analysis of new 'switch' alleles we have to set up groups of mice in which new 'switch' alleles are combined with validated 'reporter' alleles. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents)

To validate inducibility of 'switch' alleles we will test on average 5 conditions and the read out will be done using reporter mice as described above.

For validation of new 'reporter' alleles we have to set up groups of mice in which new 'reporter' alleles are combined with validated 'switch' alleles. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents).

For each new application to somatically introduce 'switch' alleles (e.g. viral) we will use on average 5 variables. For these experiments we will use validated 'reporter' strains. The nature of the variables depends on the application (e.g. dosage).

To validate the functionality of conditional alleles we will combine the new conditional allele with validated 'switch alleles'. This will be done by cross breeding which involves more mice due to Mendelian transmission (for each experimental mouse on average 4 mice are needed excluding parents).

According to the *'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren'* (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice involved in these experiments are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

The numbers are based on a group size of 5 animals for all of these analyses as in our experience this number is sufficient to draw firm conclusions.

nr mice needed	analysis	breeding	
Tool box lines			
<i>Constitutive activity</i>			
Expression analysis	5	15	
Functional analysis:	5	30	
Total per line	10	45	
3 lines per modification	30	135	
10 modifications	300		1350
<i>Inducible activity</i>			
Expression analysis	5	15	
Functional analysis (5 conditions)	25	120	
Total per line	30	135	
3 lines per modification	90	405	
10 modifications	900		4050
<i>Reporters</i>			
Expression analysis	5	15	
Functional analysis:	5	30	
Total per line	10	45	
3 lines per modification	30	135	
5 reporter lines	150		625
Somatic 'switch' gene introduction			
5 variables (e.g. dosage) + control	30		
25 applications	750		
Conditional alleles			
Recombination validation	5	30	
2 lines per cond. allele	10	60	
25 cond. alleles	250		1500
Total experimental:	2350		
Breeding			7525
Grand total:			9875
Licensed in this application: 2350			

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.

- Generation and testing of a new 'tool box' and conditional lines is carefully considered in advance and should in principle yield new possibilities to study the effects of changes in gene activity in a complete animal.
- Before a new 'tool box' or conditional mouse line is created and tested we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already available 'tool box' strains and conditional strains of the same gene or locus. Duplicate mouse strains are not produced.

In addition we will search the literature and other resources for the most efficient technologies for induction and somatic delivery.

The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11):1755-85. doi: 10.1038).

- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background in which the subsequent experiments in this application (appendix 3 and 4) will be performed. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryos and ES cells from the relevant background.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia according to SOP will be applied

-during ear or tail clipping,

-injection either intra-muscular, intra-thoracic.

-introduction via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal,

inhalation, oral, milk duct mammary gland

-tattoo of the skin

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical intra-cranial installation

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We don't expect to find more adverse effects during cross-breeding of 'tool box' and conditional modified strains in the context of their validation.

Explain why these effects may emerge.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than mild due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled except for the mice that intracranially injected mice (< 1%) that might suffer moderate discomfort.

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577).

In our experiments the most important endpoints that apply are:

-A rapid weight loss of more than 20% of the initial body weight, in case of adult animals. In case of juvenile animals, tailored rules will apply.

-Any sign of tumor formation

-Any skin defects

-Any abnormal breathing or sign of circulatory problems.

-Any abnormal behavior or locomotion.

-In case of intracranial installation: any clinical symptoms of discomfort exceeding the level of moderate discomfort to be expected due to the intracranial installation procedure.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience so far the likelihood of this happening is low (only a very small fraction (<1%) of 'tool box' or conditional mouse strains).

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').

None of the mice that have undergone one of the listed procedures will suffer discomfort at a level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small minority of the mice will be involved in this procedure (< 0,5%).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The condition of the animals at the end of the experiment will require that the animal is humanely killed.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	Phenotyping of mice carrying germ line or temporal and/or tissue specific genetic modifications

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.

To study the effects of gene modification in all cells of the mouse we will set up cohorts of germ line modified mice and appropriate controls. First we will monitor viability and Mendelian transmission. In case the germ line modification is viable we will follow the modified mice over time and monitor development and behaviour. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at different ages. In cases of families of genes that have similar molecular activities (redundancy) or sets of complementing genes we might need to combine modification of multiple genes in order to uncover their physiological function. If germ line modification is not viable we will first characterize the phenotype at different stages of gestation. For this we will set up breeding pairs to produce pregnant females carrying modified and control foetuses.

In case we want to study gene function at later stages and in specific tissues/cell types we will take the conditional approach and combine the necessary genetic components to generate the experimental and control cohorts of mice by efficient breeding strategies. These genetic components include conditional alleles of the genes of interest and of mouse strains expressing various constitutive or inducible 'switch' genes (e.g. recombinases such as Cre, Flp) that activate the genetic modification in conditional genes.

Alternative approaches that introduce the 'switch' genes somatically will be involved as well. For example, the use of viral vectors carrying cell type specific promoters driving 'switch' gene expression. In addition, reporter systems enabling the tracing of cells carrying the modified gene of interest will be incorporated thereby refining the read out of the experiments.

Decision on timing and tissue/cell type specificity will be primarily based on the tumor type in which the gene of interest was found to be implicated in addition to their expression profile and other data. After inducing the gene modifications we will follow the mice over time and monitor development and behaviour. In addition we will perform a thorough molecular and histo-pathological analysis at on average 2 time points based on the expression and functional characteristics of the genetic modification of interest.

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

For the generation of the genetically modified and control cohorts breeding pairs will be set up in order to obtain the experimental mice with the appropriate genotype. For this the following procedures will be necessary:

1) Tissue sampling of pups for genotyping and identification

a) toe clipping performed at 5-7 days after birth OR

b) ear clipping performed after weaning. This is done under anesthesia according to SOP. The choice between toe- or ear-clip is dependent on the requirements or stage of breeding, as not always all mice need to be genotyped shortly after birth.

c) tail clipping after weaning under anesthesia according to SOP (sometimes required to obtain sufficient DNA for careful assessment of the structure of transgene insertions).

2) In case of inducible gene modification animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):

a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks

b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)

c) oral administration (maximally 5 times)

d) topical application on the skin under anesthesia according to SOP (maximally 3x).

3) For somatic introduction of gene modifications, various formulations of 'switch' gene systems can be used e.g. viral vector suspensions, liposome suspensions and DNA, RNA and proteins formulated in various solvents. In case the introduction of these systems will raise an immune response against the cells that have been targeted (e.g. viral vectors generating foreign antigens) we will supplement the drinking water of the mice with immune suppressants. For somatic introduction of the conditional gene, mice will be subjected to either one of the following procedures:

a) injection either sub-cutaneous, intra-peritoneal, intra-muscular, intra-venous, intra-thoracic; if necessary under anesthesia according to SOP (1x)

b) introduction under anesthesia according to without surgery via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland (1x)

c) surgical intra-cranial installation under anesthesia and analgesia according to SOP (1x)

d) tattoo of the skin under anesthesia according to (maximally 3x)

e) shaving of the skin and topical application (ointment) (maximally 3x)

Once the cohorts of mice carrying the relevant genetic modifications have been set up, either with or

without (somatic) induction, the following procedures will be performed:

4) Overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behavior, relative size, breeding parameters and clinical signs will all be assessed.

5) Animals are killed according to SOP; tissue/cells will be harvested and for subjected to the following procedures:

-molecular characterization directed at the following aspects:

- reporter allele expression
- presence of gene modification of interest

-histo-pathology,

-tissue culture derivation

In some cases depending on the expression and functional characteristics of the genetic modification of interest, the following additional procedures will be performed:

6) Blood sampling according to SOP at different time points after activation of the genetic modification to measure a wide range of relevant blood parameters.

7) Mice are injected with DNA labeling substances (e.g. BrdU) before short before sacrifice in order to detect proliferating cells by histo-chemistry

None of the listed procedures causes a discomfort level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small minority of the mice will be involved in this procedure (< 0,5%).

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

Gender: Both male and female mice will be used, although in some case one gender will generally be selected for gender specific reasons (e.g. to study mammary gland development).

We expect to characterize 50 new lines carrying germ line modifications. Most of the modification will be homozygous. Controls for these experimental mice will be wild type littermates.

We expect to generate 5 compound modified mouse lines carrying modified redundant or complementing

alleles. Generating the experimental mice will take significantly more mice in order to breed two modified alleles to homozygosity.

For 25 genes we expect to study their effects of conditional modification under, on average, 2 conditions e.g. in a tissue specific and/or temporally controlled fashion. In these cases we will incorporate reporter alleles to trace the cells that have undergone the modification, which will need more mice for the generation of the experimental cohorts.

For 10 genes we expect to study their effects of conditional modification after somatic introduction of 'switch' genes. For these analyses we will also make use of reporter alleles to trace the cells that have undergone the modification. On average we expect to use 2 applications of 'switch' gene delivery.

Cohorts of experimental mice in which multiple modified alleles are combined will be generated by cross breeding. This will involve a considerable number of mice.

However, according to the '*Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren*' (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice in this appendix are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

These numbers are based on a group size of 10 experimental and 10 control animals for all of these analyses as in our experience this number is sufficient to draw firm conclusions.

nr mice needed	experimental + controls	breeding	
<i>Germline modification</i>			
per line 1 time point	20	24	
3 time points	60	72	
2 lines each	120	144	
50 modified alleles	6000	7200	
<i>Compound germline modification</i>			
per compound modified line	20	96	
3 time points	60	288	
10 compound modified lines	600	2880	
<i>Conditional modification</i>			
per line + reporter	20	48	
2 time points	40	96	
2 'switch' alleles per line	80	192	
25 lines	2000	4800	
<i>Somatic 'switch' gene introduction</i>			
per line + reporter	20	48	
2 applications	40	96	
10 lines	400	960	
Total experimental	9000		
breeding		15840	

Grand total: 24840

Licensed in this application: 9000

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.

- Generation and characterization of a new lines carrying modification in cancer related genes is carefully considered in advance and should in principle yield functional information that can not be obtained by 'in vitro' studies but only in a complete animal.
- Before a new mouse line is created and phenotyped we first extensively scan the literature and public resources (EMMA/Infrafrontier, JAX, KOMP and others) for already existing data on the function of the same gene or locus. We will not duplicate the generation of mouse strains.
The publicly available resource (www.infrafrontier.eu) of genetically modified embryonic stem cells that our transgenics facility has created allows for the generation of compound GM mice without the need for subsequent breeding. This reduces the number of mice obtained by breeding efforts as all modified alleles are already present in the embryonic stem cells (Huijbers et al., Nat Protoc. 2015 Nov; 10(11): 1755-85. doi: 10.1038).
- The genetic modification will be performed as much as possible in the desired genetic background in which the experiments in this appendix will be performed. This can be achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryos and ES cells from the relevant background.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia with isoflurane will be applied

-during ear or tail clipping,

-injection either intra-muscular, intra-thoracic.

-introduction surgery via either one of the openings in the body, e.g. anal, urine tract, vaginal, intra-tracheal, inhalation, oral, milk duct mammary gland

-tattoo of the skin

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical intra-cranial installation

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The purpose of this appendix is to study phenotypic consequences of (conditional) gene modification in living mice. Since the physiological function of the genes of interest is not known and in fact the aim of these studies and we cannot exclude the occurrence of adverse effects in some of the generated (compound) modified mouse strains. However, based on our 30 years' experience in this type of studies we expect that less than of 10% of the animals the phenotype will be affected and half of these might suffer unexpected discomfort. The nature of the adverse effects and level of discomfort is unpredictable. Rarely, mice are born (the F0 founders) with elephant teeth or showing a severely retarded development, but this also occurs during normal breeding.

In all cases mentioned above the affected animals will be killed immediately in order to limit the discomfort level to moderate

Explain why these effects may emerge.

In addition to the developmental and physiological consequences of the gene modifications for the handlings of the embryo's or ES cells (e.g. micro-injection or modification per se of ES cells) during the modification procedure might perhaps cause improper development in exceptional cases that emerge in the F0 founders.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a spontaneous discomfort level higher than moderate due to the genetic modification(s) they will not be continued and culled.

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577).

In our experiments the most important endpoints that apply are:

-A rapid weight loss of more than 20% of the initial body weight, in case of adult animals. In case of juvenile animals, tailored rules will apply.

-Any sign of tumor formation

-Superficial measurable lesions (by caliper) and/or skin ulceration/necrosis.

-Any abnormal breathing.

-Any abnormal behavior.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience and published data (Dickinson et al. 2016, Nature 537: 508-514) only a small fraction (<5%) of genetically modified mouse strains might have spontaneous discomfort higher than mild.

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').

None of the mice that have undergone one of the listed procedures will suffer discomfort at a level more than 'mild' except for the surgical intra-cranial installation, which causes an estimated moderate discomfort. Only a very small number of the mice will be involved in this procedure (< 1%).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The condition of the animals at the end of the experiment will require that the animal is humanely killed.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'. 30100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 4 | Functional analysis of genetic modifications in mice under challenging 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.

For some genes the results of the analyses described in appendix 3 and existing data from other sources may indicate that their function can only be uncovered when the modified mice or tissues/cells derived from them are exposed to challenging conditions. This might be the case when they have a role in stem cell performance supporting tissue homeostasis and regeneration. Such a role could be very relevant for tumor maintenance and post-treatment relapses. This appendix 4 describes short term (pilot) experiments involving challenging conditions to obtain the leads for separate, additional licence applications that address on a broad scale and in greater depth the function of these genes.

The conditions we want to apply enable to test in a defined and reproducible fashion the ability of genetically modified tissues/cells to contribute to the restoration of damaged tissues. This approach is especially suited to address the role of genes in (tissue) stem cell function. The tissues in which we intend to perform these analyses include the skin, mammary gland, the hematopoietic system and the liver. The research in our institute has a strong focus on tumorigenesis in these tissues, which are also most suitable for the analysis of stem cell performance, since these tissues have an intrinsically high regeneration potential.

We will perform these analyses only for genes for which we have indications that they are involved in

tissue homeostasis and regeneration and the regular approach described in appendix 3 is not informative.

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

Two types of animal experiments will be carried out:

- 1) Experiments in which genetically modified animals undergo tissue damaging procedures and in which restoration of these tissues will be analysed at different time points directly.
- 2) Experiments in which recipient animals undergo tissue damaging procedures and subsequently serve as acceptors for tissues/cells transplantations from genetically modified mice. The performance of these grafts in the recipient mice will be analysed, e.g. their ability to tissue restoration, at different time points.

For the type 1 experiments, we will perform the following tissue damaging procedures in experimental mice directly:

- 1) total body irradiation according to SOP
- 2) targeted, local irradiation to damage specific tissues according to SOP
- 3) local exposure to chemical agents (e.g. naphtaline damaging lung tissue); the method of application is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the damaging agent
- 4) skin wounding under anaesthesia and analgesia according to SOP
- 5) partial mammary fat pad clearance under anaesthesia and analgesia according to SOP
- 6) partial hepatectomy under anaesthesia and analgesia according to SOP

In some cases using conditionally modified mice also carrying inducible 'switch' alleles the gene modification will be activated after the tissue damaging procedure. For this, animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):

- a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
- b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
- c) oral administration (maximally 5 times)
- d) topical application on the skin under isoflurane anesthesia (maximally 3x).

For the type 2 experiments, we will perform the following tissue damaging and transplantation procedures in recipient mice:

- 1) total body irradiation to deplete the hematopoietic system of the recipient mice followed by transplantation by intra-venous injection of bone marrow cell suspensions from genetically modified and control mice
- 2) surgical removal of small piece of the dorsal skin (wounding) of the recipient mice followed by transplantation skin tissue or skin cell suspensions from genetically modified and control mice under anaesthesia and analgesia in the wounded skin of recipient mice
- 3) mammary fat pad clearance of recipient mice and transfer of mammary gland tissue or mammary cell suspensions from genetically modified or control mice in cleared fat pads of recipient mice under anaesthesia and analgesia.

Transplanted tissues or cells may carry reporter alleles in order to accurately distinguish between

transplanted and host tissues/cells.

In some cases the gene modification in the donor tissue will may be activated after transplantation of tissues from conditionally modified mice carrying inducible 'switch' alleles. For this, after grafting the recipient animals will be exposed to the appropriate inducing 'switch' gene activation agents or control substances by one or more of the following routes (the best administration route and schedule is determined by the physicochemical nature/pharmacological properties of the inducing agent and the required extent and timing of the intended deletion):

- a) in diet or drinking water, for maximally 2 weeks
- b) intra-peritoneal injection (maximally 5 times)
- c) oral administration (maximally 5 times)
- d) topical application on the skin under isoflurane anesthesia (maximally 3x).

Once the cohorts of recipient mice carrying the relevant tissue damage have been set up, either with or without tissue/cell suspension transplantation, the following procedures will be performed:

-assessment of regeneration of the affected tissue by histopathology

-overall monitoring of mice for spontaneous phenotypic abnormalities, including regular weighing to monitor growth and possible development of obesity. Appearance, size, growth, behavior, relative size and clinical signs will all be assessed.

-i.p. injection with DNA labeling substances (e.g. BrdU) before sacrifice in order to detect proliferating cells

-animals are killed according to SOP; tissue/cells will be harvested and for subjected to the following procedures:

- molecular characterization directed at the following aspects:
 - reporter allele expression
 - presence of gene modification of interest
- histo-pathology,
- tissue culture derivation

Welfare assessment:

Mice are monitored daily as part of the standard care by the Animal Facility. In addition the mice will be checked frequently by the researchers for the several parameters as described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 January 2013. The parameters are: appearance, relative size, behavior and posture, growth, coat condition, fertility and mortality figures, and clinical signs. In case of any discomfort more than mild the frequency will be increased.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. All techniques are state-of-the-art and are proven effective in modulating inducible gene modification and characterizing GM mice with minimal numbers of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: Wild-type and GM mice. Wild-type mice are in part obtained from registered commercial companies; all other mice are obtained from internal breeding programs. Our institute is a license holder with NVWA.

All mice will be enrolled as adult.

Gender: Both male and female mice will be used, although in some case one gender will generally be selected for gender specific reasons (e.g. to study mammary gland development).

We expect to characterize the effects of 30 genetic modifications in type 1 experiments: 13 in mice after damaging by irradiation, 5 after tissue damaging by agents, 5 after skin wounding, 5 after partial mammary fat pad clearance and 2 after hepatectomy.

Per experiment we will use 10 experimental and 10 wild type control mice as in our experience these numbers are sufficient to draw significant conclusions.

In type 2 experiments we expect to analyze the transplants from 18 GM lines: 6 after bone marrow transplantation, 6 after skin/cell transplantation and 6 after mammary tissue/cell transplantation. For these transplantation experiments isogenic recipients will be used in order to immunologically match donor and recipient and to maximize the take rate of the transplants.

Per experiment we will use 10 recipients for transplantation of experimental tissue/cells and 10 recipients for transplantation of control tissue/cells as in our experience these numbers are sufficient to draw significant conclusions.

According to the 'Herziene Wet op de Dierproeven: het genereren, fokken, genotyperen, monitoren en huisvesten van genetisch gewijzigde dieren' (Versie: oktober 2016), a CCD license approval is needed only for experimental mice. Mice necessary for breeding do not have to be included.

The numbers of experimental and breeding mice involved in these experiments are listed below. The number of experimental mice are indicated in roman (and the number of additional breeding mice in italics).

nr mice needed	experimental + controls	<i>breeding</i>	
<i>Type 1 experiment</i>			
per GM line 1 time point	20	72	
3 time points	60	216	
30 GM lines	1800		6480
<i>Type 2 experiment</i>			
per GM tissue/cell transplant	20	96	
3 time points	60	288	
transplants from 18 GM lines	1080		5184
Total experimental	2880		
breeding			11664
Grand total:	14544		
Licensed in this application:	2880		

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.

- The experiments to address the involvement of genes in stem cell performance and tissue regeneration using genetically modified mouse lines are carefully considered in advance and should in principle yield functional information that cannot be obtained by 'in vitro' studies but only in a complete animal. We will perform these experiments only for genes for which data from literature or our own results (e.g. from experiments described in appendix 3) strongly indicate a role in stem cell performance and tissue regeneration.
- All transplanted tissues or cells will carry reporter alleles in order to accurately distinguish between transplanted and host tissues/cells. This increases the sensitivity of the analyses and reduces the number of mice necessary for drawing sound conclusions
- In case of transplantation assays, if possible we will use recipient mice for both experimental and control transplant (e.g. skin transplantations on the left and right dorsal site). This improves the experimental setting and reduces the number of mice needed without increasing discomfort.
- The genetic modifications have been introduced in mice as much as possible in the desired genetic background in which the experiments in this appendix will be performed. This has been achieved by using gene editing technology in pre-implantation embryo's and ES cells from the relevant background.

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

1) All mice are monitored daily for signs of discomfort.

2) There are no negative environmental effects; all mice are housed in controlled environments in individually ventilated cages (IVC). Mice get additional cage enrichment (for instance a mouse home and paper tissues) when housed solitarily (while minimized as much as possible, this is sometimes required during the genotype screening phase) and also when signs of distress are observed. In these cases monitoring will be intensified.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and

provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia according to SOP will be applied when animals are exposed to

-total body and targeted, local irradiation

Anaesthesia and analgesia will be applied according SOP

-during and after surgical removal of small piece of the dorsal skin

-mammary fat pad clearance

-hepatectomy

Analgesia according to SOP will be applied

-after application of tissue damaging agents

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Depending on the damaging treatment mice might suffer from anaemia, local pain and general malaise.

Explain why these effects may emerge.

Irradiation causes bone marrow failure leading to anaemia and malaise; other tissue damaging treatments might cause pain due to local inflammatory lesions.

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

The mice are monitored daily. Action will be taken on the same day if unexpected adverse effects show up. In these cases mice will be taken out of the experiment when discomfort exceeds the level of moderate.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In case mice are assessed as having a discomfort level higher than moderate they will not be continued and culled.

We expect a significant number of animals will be taken out of the experiment because of the risk that they will suffer discomfort more than moderate. We are experienced in recognizing the symptoms that are involved in the challenging procedures and therefore we will be able to adequately monitoring these animals, enabling us to prevent suffering of discomfort more than moderate.

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577).

In our experiments the most important endpoints that apply are:

-A rapid weight loss of more than 20% of the initial body weight, in case of adult animals. In case of juvenile animals, tailored rules will apply.

-Any sign of tumor formation

-Superficial measurable lesions (by caliper) and/or skin ulceration/necrosis.

-Any abnormal breathing or sign of circulatory problems.

-Any abnormal behavior or locomotion.

-In case of described experimental procedures: any clinical symptoms of discomfort exceeding the level of moderate discomfort to be expected due to the experimental procedures. Any sign of non-healing wounds due to experimental procedures.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of exceeding discomfort level of moderate depends on the treatment. For this incidence we estimate the following for the treatments we will use:

total body irradiation:	<50%
exposure to damaging agents:	<5%
hepatectomy	<20%
other treatments	<5%

K. Classification of severity of procedures

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

For all experimental mice we expect a discomfort level of moderate. The mice are monitored daily. Animals will be taken out of the experiment when discomfort exceeds the level of moderate.

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.

The condition of the animals at the end of the experiment will require that the animal is humanely killed.

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.

x Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Postbus 90203

1006 BE AMSTERDAM



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
AVD301002017840

Bijlagen

1

Datum 27 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 20 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Functional analysis of genes implicated in cancer" met aanvraagnummer AVD301002017840. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u vraag L bij de verschillende bijlagen ingevuld en heeft u aangegeven gebruik te maken van beide geslachten in bijlagen 3.4.4.2, 3.4.4.3 en 3.4.4.4, tenzij u specifiek relevante redenen heeft om dieren van één geslacht in te zetten in specifieke experimenten. Daarnaast heeft u de humane eindpunten verhelderd.

Beslissing

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Functional analysis of genes implicated in cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 27 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie NKI gevoegd. 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 hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 14 februari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft aangegeven dat de voorwaarde van beoordeling achteraf ten onrechte in het DEC advies was gesteld en heeft een aangepast advies gestuurd.

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.

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).

Datum:

27 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD301002017840

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017840



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut -
Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis

Adres: Postbus 90203

Postcode en plaats: 1006 BE AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 30100

deze projectvergunning voor het tijdvak 27 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Functional analysis of genes implicated in cancer" met aanvraagnummer AVD301002017840, volgens advies van Dierexperimentencommissie NKI. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 januari 2017, ontvangen op 20 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 februari 2017

Aanvraagnummer:
AVD301002017840

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 General welfare assessment of newly generated genetically modified (GM) mice				
	Muizen (Mus musculus) /	2.050	10% Matig 90% Licht	
3.4.4.2 Validation of conditional genetic modification technology				
	Muizen (Mus musculus) /	2.350	0% Matig 100% Licht	
3.4.4.3 Phenotyping of mice carrying germ line or temporal and/or tissue specific genetic modifications				
	Muizen (Mus musculus) /	9.000	1% Matig 99% Licht	
3.4.4.4 Functional analysis of genetic modifications in mice under challenging conditions				
	Muizen (Mus musculus) /	2.880	100% Matig	

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.

Aanvraagnummer:

AVD301002017840

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:

AVD301002017840

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:

AVD301002017840

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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 NTS2017841	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Machtiging				x		x	x	
7	DEC-advies				x				
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x		
10	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD			x					
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				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 > Vul uw deelnemernummer in 11400															
		<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">Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>64156338</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>de Boelelaan</td><td>1117</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	64156338		Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117			
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	64156338																
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117															
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>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1081HV</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2"></td></tr></table>	Postbus			Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer					
Postbus																	
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam															
IBAN																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>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 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 | 01-06-2017 |
| Einddatum | 31-05-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres | Amsterdam Nederland |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287
	<input type="checkbox"/> Wijziging € Lege
4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
	<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur*
<i>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.</i>	* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.
	Inkoopordernummer: [REDACTED]
	Factuuradres: Afdeling Crediteuren, VU Medisch Centrum, [REDACTED] [REDACTED]

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input checked="" type="checkbox"/> Appendici 1 en 2

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:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:										
	<ul style="list-style-type: none"> 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. 										
Centrale Commissie Dierproeven Postbus 20401 2500 EK Den Haag	<table border="1"> <tr> <td>Naam</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>23 - 01 - 2017</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> </table>	Naam	[REDACTED]	Functie	[REDACTED]	Plaats	Amsterdam	Datum	23 - 01 - 2017	Handtekening	[REDACTED]
Naam	[REDACTED]										
Functie	[REDACTED]										
Plaats	Amsterdam										
Datum	23 - 01 - 2017										
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'.
- 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.

In the Netherlands, each year around 1500 people are diagnosed with a cancer in the brain (www.cijfersoverkanker.nl). These brain tumours can be a primary tumour, which originates from brain tissue or a secondary tumour, which has metastasized from a different location towards the brain. The majority of primary brain tumour patients have a dismal prognosis with a survival of only several months

to a few years. Treatment options for these groups of patients are very limited as most malignant tumours of the CNS grow in a very invasive fashion, with cells spreading throughout the brain.

Although brain tumours are most common in the elderly, they occur in every age group. In children, brain tumours even constitute the main cause of cancer-related death (Mueller & Chang 2009), and median survival and therapy response are even worse for children than for adults. One of the main obstacles hampering therapy in children is that radiation of the brain is not possible in young children - under age 3 - due to severe side effects in this age group (Packer et al. 2013). Another obstacle for effective treatment of aggressive brain tumours, in both adults and children, is that chemotherapy often fails due to the existence of the blood-brain barrier. Under normal circumstances, this barrier functions as a 'filter' to protect the brain from harmful substances. In brain tumours however, this barrier also prevents therapeutics from reaching the tumour, thereby causing tumour resistance to therapy. Furthermore, cells in different topological locations within the brain behave differently. Cells in different locations have different patterns of resistance to drugs, thus impeding (the development of) effective drug-based therapy. Patient outcome is also impaired because brain tumours display a large heterogeneity, both between patients and within one tumour (Inda et al. 2010; Northcott et al. 2012; Taylor et al. 2012; Louis et al. 2007). This heterogeneity makes it difficult to attack all tumour cells with a single therapeutic agent. Finally, the diffuse growth characteristics and the location of the tumour hamper complete surgical removal. Also radiotherapy, which is directed mainly to the tumour core to spare the surrounding brain tissue, is not very effective in these diffuse tumours. Cells outside the tumour core will survive and cause tumour recurrence. Consequently, radiotherapy - often in combination with chemotherapy - offers an improvement in survival of only several months.

This project describes firstly the induction of brain tumours in mice and secondly the use of therapeutic interventions to treat these brain tumours. These animal experiments aim to provide insight into the biology of malignancies of the central nervous system, optimize existing therapies, discover novel drugs, therapeutic targets and strategies and to enable effective delivery of pharmaceuticals.

In the example below we demonstrate a performed study which illustrates the interaction and coherence between the research objectives, and give an indication of typical timelines. Moreover, it shows the good interaction between our research group and the clinic, imaging facility, drug development department, and external research partners. The study started with an [REDACTED] on a child which had died due to a malignant brain tumour.

“A [REDACTED] year old [REDACTED] died [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] resulting in a

delay of disease related symptoms of several weeks as compared to the control group.”

With the findings of the proposed animal experiments of this project we aim to find new ways to treat some of the most difficult to treat tumours in current day oncology and provide a platform for the translation of laboratory findings towards clinical trials.

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 the proposed study is to develop new therapeutic strategies for the treatment of brain cancer. To achieve this, we will develop new brain tumour models and test therapeutic options on both these new and existing brain tumour models.

The objective, although ambitious, is within reach of the capabilities of our research group and the proposed project is feasible within 5 years. Over the past years, our research group has significantly contributed to the discovery and development of novel therapeutic strategies for brain tumour patients. Our research group has substantial funding for this project and is embedded in a large consortium of research groups within the [REDACTED]. [REDACTED] includes the departments [REDACTED].

[REDACTED] Furthermore, we have active collaborations with other institutes including [REDACTED].

[REDACTED] These partners will supply us with all the technical know-how for techniques including imaging, molecular characterization and compound preparation. Our research group has all the necessary expertise regarding brain tumour biology, animal handling and performing of the animal experiments. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings and are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

The project will consist of two experimental objectives which are strongly intertwined within each other.

These 2 experimental objectives are:

1) **Develop brain tumour model.**

Brain tumours will be induced by transplantation of human primary tumour material obtained from the operating theatre or from autopsy; by transfer of cell lines from a donor mouse to a recipient; or with the use of established cell lines.

Transplantation of human primary tumour material is necessary to develop new brain tumour models which represent the tumour heterogeneity. If this tumour material forms a tumour in the injected mice, the cells will be processed *in vitro* before re-injecting them to new donor mice.

Transplantation of *in vitro* cell lines into donor mice is necessary for testing therapeutic interventions.

Tumour progression will be monitored with relevant imaging and analysis techniques as depicted in the attached appendices. After killing the animals, brains can be processed for histological analysis to unravel mechanism of tumour progression or for DNA/RNA profiling and proteomics to detect novel pathways.

2) **Brain tumour treatment.**

Therapeutic strategies for the treatment of brain cancer will be tested in induced brain tumour models. The therapeutics are chosen after extensive *in silico* and *in vitro* testing as depicted in Figure 1. The dosing will be based on already known pharmacokinetic and toxicity data. The route of administration will depend on the ability of the therapeutic to by-pass the BBB, as denoted in the decision tree in the attached appendices 1 and 2.

Therapy effectiveness or tumour progression will be observed by imaging techniques including MRI, [REDACTED] and BLI or measurement of tumour specific markers in blood or serum. To see if therapeutics bypass the BBB techniques such as MRI with contrast enhancement, [REDACTED] or *ex vivo* characterization of tissues are being used.

Figure 2 (section 3.4.1) shows the maximum number of mice which can enter each experimental phase of this project and what the expected discomfort is at these experimental phases. Furthermore, this Figure 2 shows the strong coherence between the two types of experiments.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Despite the efforts in brain tumour research during the last centuries, only limited progress has been made regarding the prognosis of these brain tumour patients. For example, the median survival time of glioblastoma patients has only improved from 10 months in 1990 to 15 months at present (Woehrer et al. 2014). This underlines the importance of research in this specific area of oncology. The research is needed to improve our understanding of the development and progression of brain tumours; to develop novel therapeutic agents and to develop administration strategies to treat brain tumours. Additionally, many parts of this project will have an impact on other fields of research; a better understanding of the blood-brain barrier for example, will certainly help research into other neurological disorders, such as Alzheimer's disease or Multiple Sclerosis. A major advantage is the existence of research groups studying these disorders within the same university ensuring a dual benefit from these developments. Furthermore, the brain tumour models as described above will gain fundamental insight into the progression of cancer in general and discovery of novel therapeutic targets or strategies. These will obviously have an impact on research in other areas of oncology.

Social relevance:

With 1500 patients diagnosed with cancer in the central nervous system each year in the Netherlands across all ages, the impact on society of these diseases can be considered to be high. Importantly, the lack of effective therapeutic strategies, and in the case of paediatric glioma of any evidence-based treatment, creates a hopeless situation for all persons involved, including families and friends. Additionally, since brain tumours can occur at every age, and given the impact on the patients' social life, these diseases have large economic consequences in terms of healthcare costs and loss of productivity. The aims of this project not only aim to improve survival of brain tumour patients, but also the quality of life of patients and thereby, indirectly, of their relatives and social system.

3.4 Research strategy

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

As of today, the standard treatment for high grade brain tumours is surgical resection – which never removes all cancer cells – followed by radiotherapy, chemotherapy with temozolomide, or both radiotherapy and chemotherapy simultaneously. Unfortunately, this prolongs survival of patients with high grade tumours by a few months only. Our laboratory research is focused on identifying new therapeutic targets aimed at reducing tumour growth and/or sensitizing tumour cells to radiotherapy or chemotherapy.

For the identification of therapeutic targets, cell lines are a useful instrument. Many brain tumour cell lines are available to study different aspects of brain cancer. However, as the World Health Organization (WHO) recognizes approximately 190 different molecular subtypes of brain tumours (Louis et al. 2016), there is still a lack of representative models for many of these tumour subtypes. In order to develop therapeutic strategies with a high potential of actually being effective in patients, there is a need for more, well-characterized, cell lines representing this tumour heterogeneity. We focus on high grade brain tumours, which are tumours that have the worst patient outcome. Because many cell lines do not grow

immediately *in vitro* after the collection of tumour cells directly from patients, it is necessary to inject these tumour cells immediately after the operation or autopsy procedure into the mouse. At the time of obtaining the tumour cells, the exact molecular subtype is not known yet. If this results in tumour engraftment, the cells can be re-collected from this donor mouse and these newly-derived cell lines often have gained the capacity to grow *in vitro*. These newly derived cell lines will be used alongside the already known, well-described, cell lines for the development of new treatment strategies.

New treatment targets strategies are identified from *in silico* and *in vitro* analyses. This is done by the use of several laboratory techniques, including RNA sequencing and screening of drug-libraries on the cell lines, but also literature studies, or *in silico* analysis. Moreover, collaborations with our national and international research partners will give us new leads to identify and develop novel therapeutics. These newly identified therapeutic agents can include chemotherapeutics, small molecules, biologicals, nanoparticles and gene targeting therapies. These can be tested as single agents or in combination with one another to improve anti-tumour efficacy in the heterogeneous brain tumours.

In vitro tests are also used to predict toxicity in order to limit unwanted side effects, morbidity and mortality. In order to translate the laboratory findings to clinical trials, we will establish the safety and efficacy of (combinations of) compounds in the appropriate animal models. Additionally, new strategies and applications to circumvent or modify the blood-brain barrier, such as [REDACTED], will be developed and tested, either alone or in combination with aforementioned compounds, to improve drug delivery to the site of the tumour. Figure 1 illustrates the overall design of this project from the collection of patient-derived materials via *in vitro* testing and animal experiments towards clinical application.



Figure 1: Different research phases to go from patient-derived tumour material to clinical application

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.

In this project, the main animal procedure will be intracranial injection of tumour cells. Tumour cells will be selected based on the brain tumour (sub)type, growth characteristics, presence or absence of molecular targets, or other relevant parameters. For tumour induction, tumour cells will be injected into the brain of a suitable mouse strain. Appropriate anaesthesia and pain control will be applied before, during and after this surgical procedure. Tumour progression will be monitored by measurement of blood values or one or more imaging techniques including bioluminescence imaging, intravital microscopy, [REDACTED] MRI, CT or [REDACTED]. Based on the experimental question, the relevant technique, or combination of techniques, will be chosen (see appendices 1 and 2 for details).

The wellbeing of the mice will be monitored by observing the behaviour of the mice, measuring body weight and, if applicable, neuronal activity (EEG) or behaviour.

The second type of animal experiments is the administration of therapeutic agents. The administration route and dosing for therapeutic interventions will be based on available information with respect to toxicity, distribution and kinetics of the compound and predicted (or proven) ability to pass the blood-brain-barrier (see appendix 2 for details).

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.

Figure 2 describes the relation between the two types of animal experiments, namely tumour transplantation and treatment. 'Go/No Go' selection points are explained in the figure legend.

Typical time lines for the tumour engraftment are 1-4 weeks for cell lines and up to 1.5 year for primary tumour materials. Treatment studies have a follow up of several weeks for fast growing cell lines to up to 1 year for slow growing cell lines.

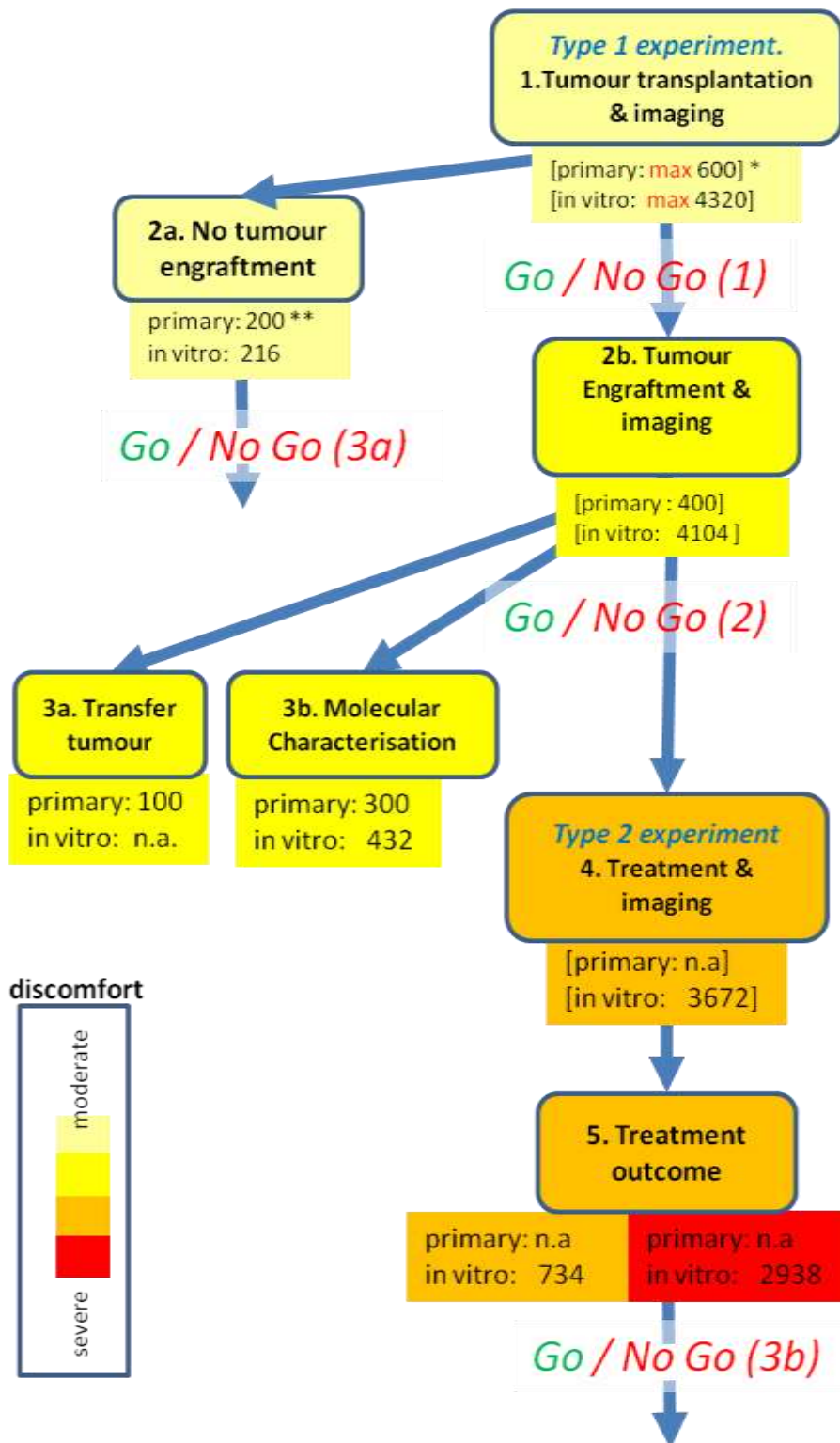


Figure 2: Flow chart of the project Brain tumour cells are either obtained directly from a patient (primary) or are cultured *in vitro*. The expected maximum number of mice for each experimental phase is depicted. Expected severity in each experimental phase is colour coded where red indicates severe discomfort and yellow to orange moderate

discomfort. In type 1 animal experiments; the cells will be injected into the mouse. Dependent on tumour engraftment, a 'Go/No Go' decision is being made (1). For primary tumours, we expect a tumour engraftment of 66%, for *in vitro* cultured cells we expect engraftment 95% of injected mice. For mice with tumour engraftment a second 'Go/No Go' decision is made (2) where mice are either killed (3a + 3b) or included in a treatment study (4). If mice are killed at this 'Go/No Go' point; tumours are collected, processed and the resulting *in vitro* cell lines are transferred to new recipient mice (3b. Transfer tumour), or the tumours are molecularly characterized (3b). For the imaging of tumours, several imaging tools are available. A decision tree to choose the most appropriate imaging tools is given in the appendices. Type 2 experiments involve the treatment of tumour bearing mice. Mice are treated (4) based on the pharmacokinetic properties of the treatment as depicted in the decision tree in appendix 2. We expect that in 20% of the treated mice tumour progression will be significantly inhibited resulting in moderate/severe discomfort and in 80% of the treated mice discomfort will be severe. Based on the engraftment or treatment outcome there are 'Go/No Go' decision points (3a and 3b) where it is decided if the experimental procedure has to be repeated with altered experimental parameters. This decision to repeat the experiment will always be made after consulting the IvD. Tumour progression will be monitored by the appropriate imaging tools as depicted in the decision trees in both appendices.

References

- Inda, M. et al., 2010. Tumour heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. , pp.1731–1745.
- Louis, D.N. et al., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), pp.97–109.
- Louis, D.N. et al., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), pp.803–20.
- Mueller, S. & Chang, S., 2009. Pediatric brain tumours: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(3), pp.570–86.
- Northcott, P.A. et al., 2012. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*, 488(7409), pp.49–56.
- Packer, R.J. et al., 2013. Survival and secondary tumours in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: results of Children's Oncology Group trial A9961. *Neuro-oncology*, 15(1), pp.97–103.
- Taylor, M.D. et al., 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathologica*, 123(4), pp.465–472.
- Woehrer, A., Bauchet, L. & Barnholtz-Sloan, J.S., 2014. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Current opinion in neurology*, 27(6), pp.666–74.

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	Protocol for brain tumour transplantation
2	Protocol for treatment of brain tumours
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'.	11400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	VUmc	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 01	Type of animal procedure Protocol for brain tumour transplantation

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 appendix describes the protocol for development of brain tumour models. The brain tumours are induced by transplantation of tumour material or cells to mice. This tumour material can be either of mouse origin (for syngeneic tumour models) or from human origin (for xenograft transplantation models). Tumour cells can be obtained either from primary tumour material derived during surgical removal of the tumour, from biopsy or autopsy or from cells which were cultured previously in the lab. We describe the use of mice in which a cell line or tumour suspension or a tumour piece is either ectopically or orthotopically injected/implanted. The selection of tumour cells will be based on clinical relevance and expression of specific markers. The use of primary tumour material (e.g. directly obtained from a patient) is necessary to obtain new models of tumours which could not be studied before. Transplantation of cell lines will in general result in reproducible and robust tumour engraftment and growth. The primary outcome parameters will be based on tumour progression (as monitored visually, by imaging or diagnostics) or survival (humane endpoints). Furthermore biological effects will be determined in blood or relevant tissues after resection and/or collection of these materials.

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

Tumour cells will be transplanted mainly orthotopical (e.g. in the same location where the tumour grows in humans) into the brain of mice. This approach of intracranial injections of brain tumour cells is relevant because this is the location where these tumours normally grow and therefore necessary to make comparisons with the human situation. Alternatively, for expansion of cells with special growth

characteristics or to study the effect of (the lack of) the blood-brain-barrier, tumours will be transplanted by subcutaneous (s.c.) injection of cells or by s.c. implantation of a tumour piece (ectopic transplantation). We expect to inject 95% of the tumours intracranial and only 5% of the tumours s.c. The tumour progression will be monitored with appropriate imaging techniques. Animal wellbeing will be monitored closely by observing animal behaviour and body weight.

All tumour transplantation procedures will be performed under appropriate analgesia and anaesthesia. The discomfort of the injection/transplantation procedures will be moderate, mainly due to recovery from anaesthesia.

The time of follow up of the tumour progression in the research animals will be dependent on the tumour cells themselves. For primary cell lines it is known that tumour progression can take more than one year, whereas for most established cell lines tumour progression is observed in weeks or months. The discomfort due to tumour growth can be severe when grown to a size that humane endpoints are reached (loss of body weight >20%, abnormal posture, inactivity, neurological deficits, etc.). Because symptoms related to brain tumour progression can develop quickly (even within one day) it is not possible to completely prevent severe discomfort in these brain tumour models.

Due to their location within the skull, brain tumours cannot be studied visually or by palpation. Therefore, more advanced imaging techniques are required to be able to study the biology, progression and response to therapy of brain tumours (Figure 1). We hereby provide short descriptions of relevant preclinical imaging techniques that are available at our institution. These techniques have been extensively validated at our institute and we have substantial experience in their application. Although the imaging itself can be considered non-invasive, it will -as indicated below- often require administration of a sedative, anaesthesia and/or contrast agent, thereby rendering it minimally invasive. For the more invasive imaging techniques, surgical procedures will be performed under appropriate anaesthesia and analgesia techniques, comparable with the ones used during tumour implantation. The duration of anaesthesia is dependent on the specific imaging technique and may last anywhere from 1 minute (for basic bioluminescence imaging) to 6 hours (for highly detailed intravital microscopy). During lengthy imaging procedures (>5 minutes), precautions will be taken to prevent dehydration and hypothermia of the mice.

The described imaging techniques provide either anatomical information, such as tumour size and growth pattern of the tumour, or functional information. The latter may consist of information on metabolism, electrical nerve activity, blood flow, or chemical composition of areas of tumour involvement. Based on the research question, the most optimal imaging technique will be selected. Additionally, combination of 2 or more of these techniques may reveal important pharmacokinetic information, such as tumour uptake of a certain drug or presence of a certain therapeutic target. These measurements are all vital parts of our quest to understand and eventually treat brain tumours. Our facility and experience give us the unique opportunity to study these phenomena in relevant *in vivo* brain tumour models.

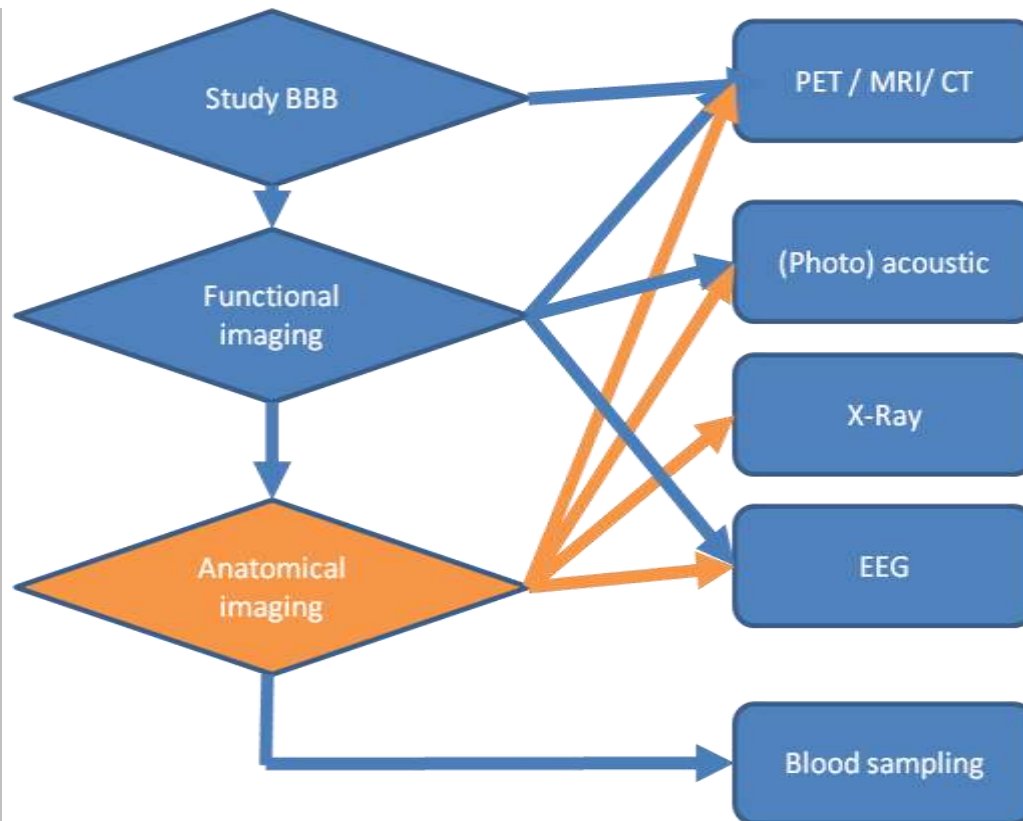


Figure 1. Decision tree for the selection of imaging techniques. For pre-clinical imaging of primary brain tumours, a wide variety of imaging techniques is available. For each experiment the selection of imaging technique will be based on the research question and used brain cancer cells. All techniques, typical imaging times and discomfort are described elsewhere in this document.

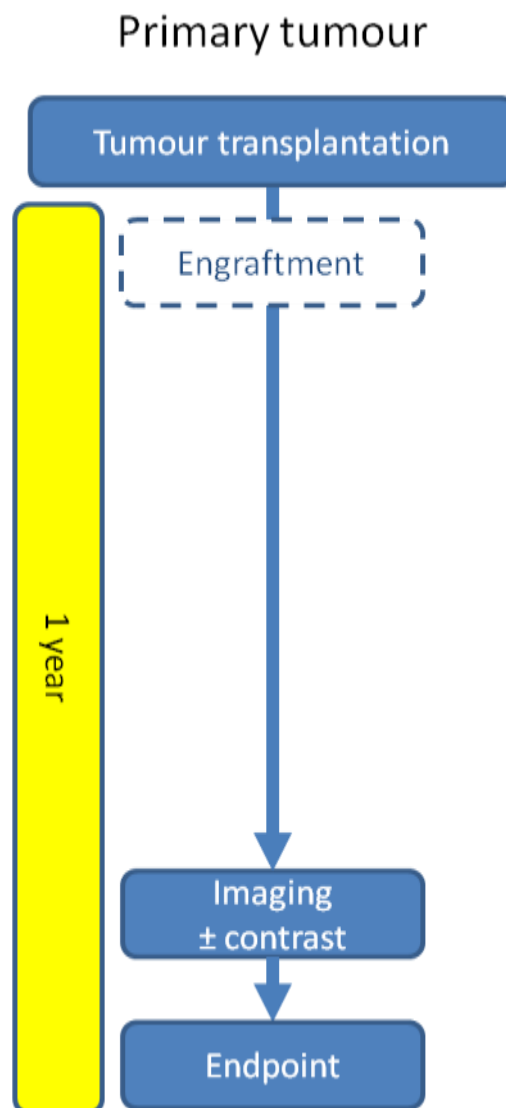


Figure 2: Example of a primary tumour model experiment.

A primary tumour is transplanted. Whenever the animal develops symptoms which indicate progressive disease, an MRI is performed with contrast enhancement to visualize the tumour and the BBB integrity. The time between tumour transplantation and endpoint is typically around one year. Imaging techniques, such as MRI, are applied at the end of the experimental period, when the first animals develop signs of tumor progression such as gradual weight loss. BBB=Blood Brain Barrier, MRI=Magnetic Resonance Imaging

Minimally invasive techniques

MRI: Magnetic Resonance Imaging (MRI) makes use of strong magnetic fields and radiowaves to create images of organs and tissues. When combined with the use of contrast agents, this technique can be used for both anatomical and functional imaging. MRI is performed under isoflurane inhalation anaesthesia; typical imaging time is 1-2 hours. The MRI is painless, discomfort due to anaesthesia and i.v. injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2x per week.

X-ray: X-rays are a form of electromagnetic radiation. Because different tissues have a different absorption of this type of radiation, X-rays can be used to visualize the insides of a body without making incisions. This will mainly provide anatomical information. Contrast agents may be used to visualize specific aspects of the tissue and provide more functional information. X-ray imaging is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is <5 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week.

CT: Computerized Tomography (CT) scans combine a range of X-rays, taken at different angles, to obtain 3-dimensional anatomical information. With the use of contrast agents functional information, such as blood perfusion of an organ, can also be obtained. This procedure is performed under isoflurane anaesthesia, typical imaging time is <20 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Typical imaging time is <1 hour . The procedure can be repeated 2 times per week.

Fluorescence imaging: Fluorescent signals present in tumour cells, or produced after administration of so-called fluorophores, can be visualized by exposing the animal to a beam of light of a specific wavelength, after which sensitive cameras register the emitted light at a different wavelength. This can provide both anatomical and functional data, dependent on the specific system and fluorophores used. This imaging is done under isoflurane inhalation anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week. The anaesthesia will result in moderate discomfort.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] . These techniques are performed under isoflurane anaesthesia. The discomfort is moderate due to anaesthesia and injection of contrast agents. Typical imaging times are 1-2 hours. This procedure can be repeated up to 2 times per week.

Others:

Blood sampling: Nowadays, much attention in the scientific community is directed towards minimally invasive detection of tumours to facilitate early diagnosis and monitoring of tumour progression and/or response to therapy. By studying components of peripheral blood, like cells, proteins and circulating DNA/RNA, we can gather important information on tumour biology and development. This will mainly give functional information, but will also enable us to develop these techniques for future clinical use in relevant mouse models. For collection of blood we will adhere to the guidelines as presented in "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Tox 2001; 12-23". Blood is collected with a frequency and following a method that does not exceed mild discomfort.

Ex vivo histology: Tissues will be obtained at the end of the experiments, after killing the animal, to enable histological analysis. In some occasions it is necessary to perfuse animals with special fixatives to preserve the morphology and protein expression of tissues. For this purpose, animals will be subjected to overdose sedation and anaesthesia after which fixatives are administered through transcatheterial perfusion, resulting in the death of the animal. The subsequent *ex vivo* histological studies will provide both important anatomical and functional information.

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

Our research group has ample experience with the kind of experiments as described in this protocol. Based on this we expect a tumour take rate of primary tumours of approximately 66% (based on historical data).

If we inject 6 mice with primary tissue, we may expect a minimum of 3 of them to develop a tumour. Each newly developed tumour will be transplanted to 3 new mice to confirm and maintain the tumour growth.

This results in a group size of 15 mice per primary tumour.

B. The animals

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

Species: Mouse (*Mus musculus*)

Age at study start: 4 weeks to 6 months

Origin: commercial breeder or institutional breeding facility

Gender: Both male or female mice can be used. Per experimental series just one gender will be selected.

Estimated numbers (see also Figure 2 of the project proposal):

We expect to transplant the following number of mice:

For primary cell lines:

8 primary tumours per year, resulting in $8 \times 15 = 120$ animals per year (600 in 5 years)

Expected discomfort (based on 66% uptake rate in the initial tumour transplantation); 40 animals/year moderate (200 in 5 years), 80 animals/year severe (400 in 5 years)

Go/No Go: If no tumour develops, the tumour transplantation will be repeated one more time (in 6 mice) if possible. If this again did not result in tumour progression, we won't continue with this cell line/tumour source. Before the experiment is repeated, we will discuss the experimental outcome with the IvD.

Justification: Mice are the most frequently used animal models in oncology research. We have broad experience with these mice models. Much information is available with respect to available tumour models, cell lines and xenografts that are transplantable to mice. Moreover, for mice many specific reagents are available. Many of the imaging modalities, such as preclinical ██████ MRI and BLI are specially designed for optimal use with mice.

For xenograft models we will use immunocompromised mice, for syngeneic models we will use immunocompetent mice of strains with the appropriate background. Precise strains will be communicated before start of the experiment with the IvD. This strain selection depends on the requirements of the model and the tolerance of the strain for certain therapeutic interventions.

In general, we will use mice of young age (4 - 8 weeks at start of study). However, for autopsy studies we need to order mice as soon as the paediatric patient reaches a bad condition. If the patient then recovers and the procedure is postponed, the animals can be used up to an age of 6 months.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Where applicable we will study, prior to the *in vivo* studies, cell culture experiments and other evaluations to test the proposed concepts for intervention. However, since cancer is a complex disease in which there is interaction between the tumour environment and the tumour cells, these cell cultures are not sufficient to draw conclusions about treatment efficacy. Furthermore, *in vitro* studies do not take the effects of the blood-brain-barrier into account. Therefore we need *in vivo* experiments to study the treatment of this complex disease *in vivo*.

Reduction: The number of animals per study arm is based on our experience with these models and in line with generally accepted protocols. With respect to the development of primary tumours, reduction of the number of animals reduces the chance to get a valuable model from the patient, especially when it concerns an autopsy of a paediatric patient. Further reduction of the number of animals per treatment arm will have a severe adverse effect on the statistical power of the study.

Refinement: Unfortunately every successful induction of a brain tumour will result in severe discomfort. We try to keep this discomfort as low as possible by using appropriate analgesia and anaesthesia and strict humane endpoints.

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

To minimize animal suffering we will use appropriate analgesia and anaesthesia during and after surgical interventions and during imaging. Animals will be closely monitored during disease progression. We will adhere to the Code of Practice of handling lab animals in oncology.

Adverse effects on the environment are minimal with this setup. All waste will be disposed conform legal and institutional regulations.

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.

The focus of our research group is on neuro-oncology. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings. Thus, we are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Local and/or systemic analgesia, inhalation and/or injection anaesthesia.
Procedures will be communicated with and approved by the IvD before start of the experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Individual housing of animals could be expected in some occasions.

Explain why these effects may emerge.

Individual housing of animals may be needed to prevent fighting (male animals) or when the other mice within a cage have reached the endpoints

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

If possible animals will be housed group wise at young age to prevent fighting

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

The animals might reach severe humane endpoints as described in the Code of Practice of lab animals in oncology, in line with international regulations (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102; 1555-1577).

The severe endpoints cannot always be prevented because of the nature of brain tumor development. Clinical signs are often recognized only after advanced tumor progression. This tumor progression results in severe discomfort such as neurological symptoms or inactivity of the animal at which point the animal is killed within one day.

For our models the criteria for humane endpoints are:

Weight loss of more than 20% of the initial body weight.

A tumour mass more than 10% of the body weight (for s.c. tumours)

Severe abnormal behavior, like inactivity, of the animal.

Severe neurological symptoms like epileptic seizures or limping.

Indicate the likely incidence.

We expect that 66% of the mice will develop a tumour; 50% of the mice with a developed tumour will reach the severe humane endpoints.

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').

Disease related	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no/ week)	% of mice
Presence of tumor				
Subcutaneous (s.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	66
Progressed tumor (at humane endpoint)				
Subcutaneous (s.c.) tumor	moderate	< 2 days	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	severe	< 2 days	n.a.	32

Actions without anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Observation + Handling	mild	<2 min	7	100
Internal transport	moderate	<10 min	5	50
Solitary housing	moderate	*	n.a.	1
Quantification methods				
Caliper measurement	mild	<2 min	5	1
Weighing	mild	<2 min	7	100
Administration routes				
Subcutaneous (s.c.)	moderate	<2 min	14	99
Intraperitoneal (i.p.)	moderate	<2 min	14	20
Intravenous (i.v.)	moderate	<2 min	14	50
Oral gavage (p.o.)	moderate	<2 min	14	20
Blood withdrawal				
Vein cut	moderate	<2 min	**	30
Sublingual	moderate	<2 min	**	5

*Solitary housing will be avoided as much as possible, however when mice are fighting or 2 days directly after cranial window procedure this solitary housing is needed. Solitary housing may also be applicable when other mice of the cage were killed and re-arrangement of mice will affect the experiment.

**Based on maximal sampling volumes.

Actions with anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Anaesthesia	moderate	<5 min	5 ***	99
Tumor induction				
Intracranial (i.c.) tumor injection	mild	<10 min	1	97
Subcutaneous (s.c.) tumor injection	mild	<2 min	1	1
Intravenous (i.v.) tumor injection	mild	<2 min	1	2
Imaging/quantification methods				
██████████	mild	<2 hours	2	10
CT-scan	mild	<2 hours	2	10
MRI-scan	mild	<2 hours	2	50
X-ray	mild	<2 hours	2	10
Fluorescence imaging	mild	<10 min	3	5
Blood withdrawal				
Vein cut	mild	<2 min	**	10
Sublingual	mild	<2 min	**	20
Orbital puncture	mild	<2 min	**	10
Heart puncture (endpoint)	mild	<2 min	n.a.	50
Methods of killing				
Killing under anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	80
Killing without anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	20

Cumulative discomfort	% of mice
Moderate	34
Severe	66

***The maximum number of repetitions for recovery from anaesthesia is 5 times per week. On average: the anaesthesia will be provided 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To obtain tissues for analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	11400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	VUmc	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		02	Protocol for treatment of brain tumours.

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 appendix describes the induction of brain tumour models by transplantedation of brain tumour material or cells to mice. We describe the use of mice in which a cell line or tumour suspension or a tumour piece is ectopically or orthotopically injected/implanted.

The mice with the induced tumours will be treated by the investigational treatment and tumour progression will be monitored by appropriate techniques. The primary outcome parameters will be based on tumour progression (visual or by imaging) or survival (humane endpoints). Furthermore biological effects will be determined in blood, or relevant tissues after resection

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

Tumour cells will be transplanted as described in appendix 1.

The time of start of treatment will be dependent on the tumour cells used in the specific experiment. In general the treatments will be started after engraftment. For most cell lines, tumour engraftment is within two weeks, however for some tumours the engraftment may take 1-2 months. The discomfort due to tumour growth can be severe when grown to a size that humane endpoints are reached (loss of body weight >20%, abnormal posture, inactivity, neurological deficits, etc.). Due to the relatively rapid tumour growth in short time we monitor the animals closely to avoid severe discomfort as much as possible.

Treatment may involve any kind of agent, including chemicals, biologicals, cells, genetic vectors, viruses, radiation or vaccines, surgical removal of the tumour and/or combinations of those interventions. In the

case the novel treatments are directed against specific biological targets, the cell lines used for tumour transplantation will be selected based on the availability of the target. New treatments are identified by *in silico* and *in vitro* analyses. This is done by the use of several laboratory techniques, including RNA sequencing and screening of drug-libraries on the cell lines, but also literature studies, or *in silico* analyses. Moreover, collaborations with our national and international research partners will give us new leads to identify novel therapeutics. These newly identified therapeutics can be tested as single agents or in combination with one another to improve anti-tumour efficacy in the heterogeneous brain tumours. *In vitro* tests are also used to predict toxicity in order to limit unwanted side effects, morbidity and mortality. In order to translate the laboratory findings to clinical trials, we will establish the safety and efficacy of (combinations of) compounds in the appropriate animal models. Additionally, new strategies and applications to circumvent or modify the blood-brain barrier, such as CED or [REDACTED], will be developed and tested, either alone or in combination with aforementioned compounds, to improve drug delivery to the site of the tumour. Administration might be systemic (such as i.v./i.p./p.o./s.c/i.d.) or local via intratumoural injection, CED or minipumps (Figure 1). The administration route, dose and frequency will depend on the target of the intervention and will be based on known and/or expected biodistribution and pharmacokinetics. If administration requires surgical procedures, these will be performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort will be moderate for these administration routes. For other administration routes, discomfort will be mild. Details of each treatment in a study will be discussed with the IvD before start of the experiments.

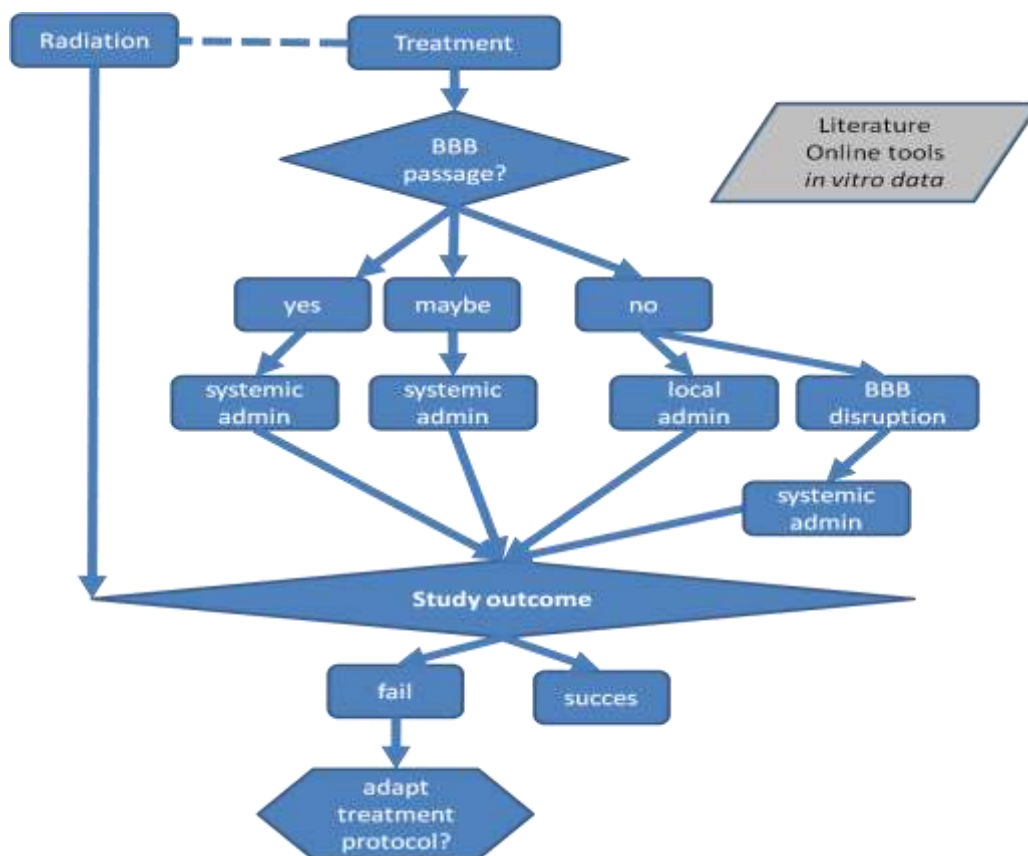


Figure 1: Decision tree for the selection of the route of administration. For each treatment, the optimal administration route will be selected *a priori*. Selection of the administration route is based on the capability to pass the BBB and on the pharmacokinetics of the compound. For effective treatment, the compounds have to pass the BBB. This capability to pass the BBB can be predicted with online tools, which are based on the chemical structure of the compound, or with *in vitro* assays. Whenever this BBB passage is unknown, the first line of treatment is by systemic administration. Local administration can be intratumoural injection or convection-enhanced delivery, or via minipumps. Other methods to bypass the BBB are by BBB disruption, either chemically (with cytokines or high osmolarity) or [REDACTED]. BBB=Blood Brain Barrier.

Due to their location within the skull, brain tumours cannot be studied visually, by palpation or by direct measurement. Therefore, more advanced imaging techniques are required to be able to study the biology, progression and response to therapy of brain tumours. We hereby provide short descriptions of the preclinical imaging techniques that are available for brain tumour imaging. These techniques have all been extensively validated and we have substantial experience in applying them.

Although the imaging itself can be considered non-invasive, it will often require administration of a sedative, anaesthesia and/or contrast agent, thereby rendering it minimally invasive. For the more invasive imaging techniques, surgical procedures will be performed under appropriate anaesthesia and analgesia, comparable with the ones used during tumour implantation. The duration of anaesthesia is dependent on the specific technique applied and may last anywhere from 1 minute (for basic bioluminescence imaging) to 6 hours (for highly detailed intravital microscopy).

During lengthy imaging procedures (>2 minutes), precautions will be taken to prevent dehydration and hypothermia of the mice.

The described techniques provide either anatomical information, such as tumour size and growth pattern and influence on the tumour (micro-)environment, or functional information. The latter may consist of information on metabolism, electrical nerve activity, blood flow, or chemical composition of areas of tumour involvement. Based on the research question, the most optimal imaging technique will be selected. Additionally, combination of 2 or more of these techniques may reveal important pharmacokinetic information, such as tumour uptake of a certain drug or presence of a certain therapeutic target. These measurements are all vital parts of our quest to understand and eventually treat brain tumours. Our facility and experience give us the unique opportunity to study these phenomena in relevant *in vivo* brain tumour models.

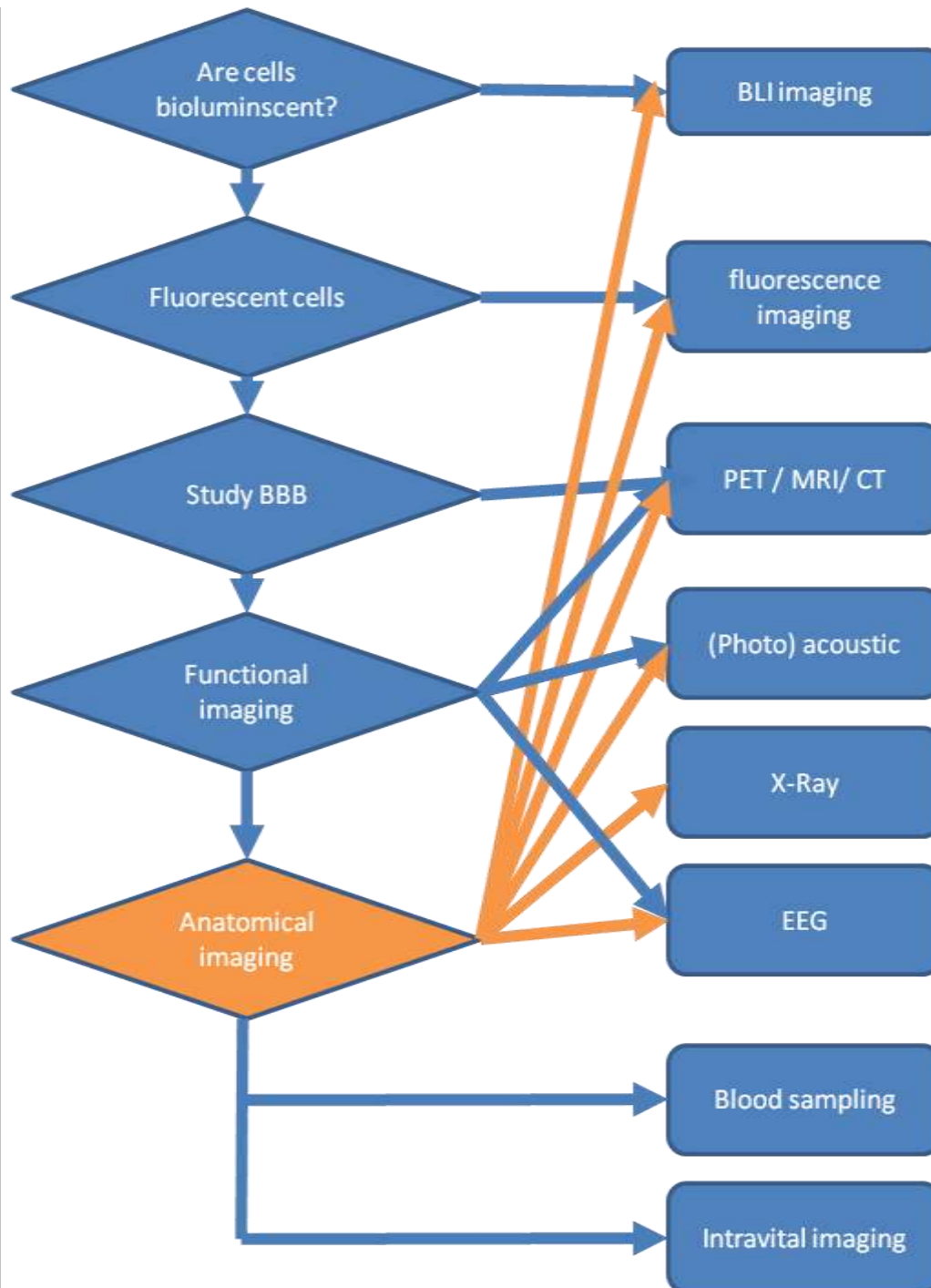


Figure 2. Decision tree for the selection of imaging techniques. For pre-clinical imaging of brain tumours, a wide variety of imaging techniques is available. Many of these are often used together (dotted lines) For each experiment the selection of imaging techniques will be based on the research question and used brain cancer model. All techniques, typical imaging times and discomfort are described elsewhere in this document. NB In typical experimental settings, 2 to 3 imaging techniques are applied (see Figure 3). It will **never** happen that all imaging techniques are being applied to one animal.

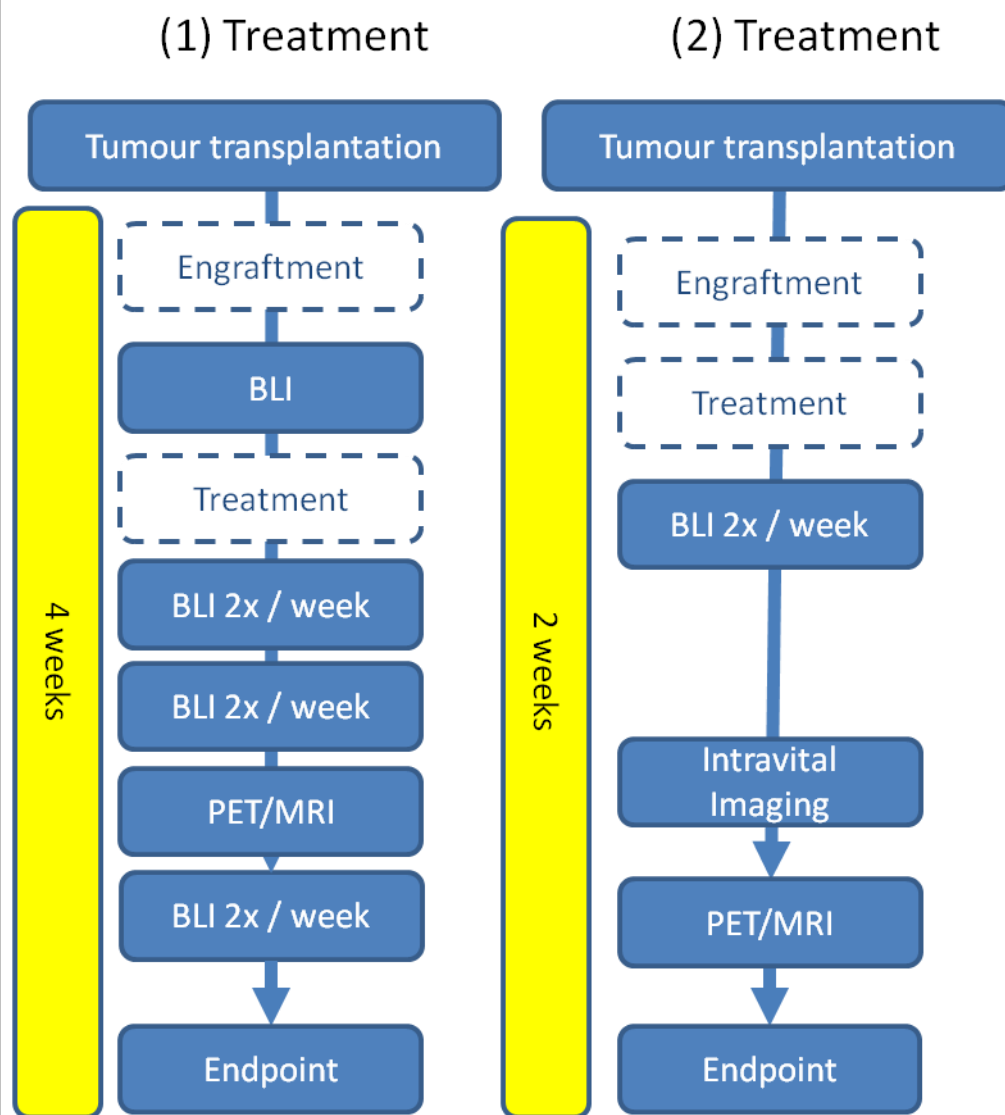


Figure 3: Two examples of study designs for the treatment and imaging of brain tumours.

(1) Standard treatment study: Tumour cells are transplanted; after one week BLI is measured and the mice are stratified into their treatment arms and treatment is started. Tumour growth is monitored by BLI imaging (twice per week); when the tumours (in the untreated control group) have progressed, a [REDACTED] is performed to get functional information. BLI imaging is continued until the determined endpoints. Typically, the time between tumour transplantation and endpoint is around 4 weeks (for the untreated control group).

(2) More complicated study design in which we want to see the influence of treatment on tumour development. In such an occasion, treatment is started shortly after tumour transplantation, BLI used to confirm tumour development and progression, followed by intravital imaging to see interactions of the tumour cells with their micro-environment and finally [REDACTED] imaging to validate the presence of specific targets.

On average, the anaesthesia will be applied up to 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks. BBB=Blood Brain Barrier, BLI=Bioluminescence Imaging, [REDACTED] MRI=Magnetic Resonance Imaging

Minimally invasive techniques

MRI: Magnetic Resonance Imaging (MRI) makes use of strong magnetic fields and radiowaves to create images of organs and tissues. When combined with the use of contrast agents, this technique can be used for both anatomical and functional imaging. MRI is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is 1-2 hours. The MRI is painless, discomfort due to anaesthesia and i.v. injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2x per week.

X-ray: X-rays are a form of electromagnetic radiation. Because different tissues have a different absorption of this type of radiation, X-rays can be used to visualize the insides of a body without making incisions. This will mainly provide anatomical information. Contrast agents may be used to visualize specific aspects of the tissue and provide more functional information. X-ray imaging is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is <5 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week.

CT: Computerized Tomography (CT) scans combine a range of X-rays, taken at different angles, to obtain 3-dimensional anatomical information. With the use of contrast agents functional information, such as blood perfusion of an organ, can also be obtained. This procedure is performed under isoflurane anaesthesia, typical imaging time is <20 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week

Typical imaging time is <1 hour . The procedure can be repeated up to 2 times per week.

BLI: Bioluminescence imaging (BLI), is the imaging of light produced in living animals. Tumour cells can be modified to produce enzymes like Gaussia or Firefly luciferase, which metabolize a specific substrate, administered during the procedure, to produce light. The localization and concentration of these enzymes can be determined by sensitive cameras after injection of their specific substrates. The intensity of the light produced is a reliable measure of tumour size. BLI imaging is performed under isoflurane anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. The procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week. Discomfort is moderate due to anaesthesia and injection of the substrate.

Fluorescence imaging: Fluorescent signals present in tumour cells, or produced after administration of so-called fluorophores, can be visualized by exposing the animal to a beam of light of a specific wavelength, after which sensitive cameras register the emitted light at a different wavelength. This can provide both anatomical and functional data, depending on the specific system and fluorophores used. This imaging is done under isoflurane inhalation anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. This procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week. The anaesthesia will result in moderate discomfort.

Typical imaging times are 1-2 hours. This procedure can be repeated up to 2 times per week.

Invasive imaging techniques

EEG: Electroencephalography (EEG) is a method to study the electrical activity of the brain. Brain cells communicate with each other through electrical impulses. Brain tumour progression will alter the pattern of these electrical impulses and, reciprocally, this altered electrical activity will influence tumour growth and biology. For preclinical research, the implantation of electrodes into the brain is needed to register the EEG signals. This technique will mainly provide functional information, although state-of-the-art software is capable of generating anatomical information from EEG patterns as well.

All surgical procedures are performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort is

moderate. The EEG measurement is performed on awake animals, discomfort of the measurement is moderate. Measurement can be repeated 2 to 3 times per week.

Intravital microscopy: With the use of dedicated confocal or multiphoton microscopes, microscopic images within tissues of living organisms can be made. For many applications, including brain research, it is necessary to apply a window through which the images can be obtained. This technique will give both functional and anatomical information. All surgical procedures to create a window are performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort of the surgical procedure is moderate. Intravital imaging is performed under isoflurane anaesthesia. Discomfort of these measurements is moderate. The measurements can be repeated up to 2 to 3 times per week.

Others:

Blood sampling: Nowadays, much attention in the scientific community is directed towards minimally invasive detection of tumours to facilitate early diagnosis and monitoring of tumour progression and/or response to therapy. By studying components of peripheral blood, like cells, proteins and circulating DNA/RNA, we can gather important information on tumour biology and development. This will mainly give functional information, but will also enable us to develop these techniques for future clinical use in relevant mouse models. For collection of blood we will adhere to the guidelines as presented in "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Tox 2001; 12-23". Blood is collected with a frequency and following a method that does not exceed mild discomfort.

Ex vivo histology: Tissues will be obtained at the end of the experiments, after killing the animal, to enable histological analysis. In some occasions it is necessary to perfuse animals with special fixatives to preserve the morphology and protein expression of tissues. For this purpose, animals will be subjected to overdose sedation and anaesthesia after which fixatives are administered through transcardial perfusion, resulting in the death of the animal. The subsequent *ex vivo* histological studies will provide both important anatomical and functional information.

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

With the therapeutic intervention studies, we consider an effect of 50% improvement in terms of tumour growth or survival between groups as relevant. To minimize the variation between groups, we will stratify the mice based on the tumour size (as measured by imaging or caliper measurement) before start of the treatments. If this stratification is not possible, mice will be randomized. In general we have a relative standard deviation around 30%. With a power of 0.9 and an alpha of 0.05 group size should be 7 animals per group. However, when we want to test multiple treatment groups we need to correct the alpha value. For an average experiment with 6 treatment arms, the alpha value will be $0.05 / (6-1) = 0.01$. This results in a group size of 10 evaluable mice when performing a 6-arm study group. We anticipate that 15% of the mice are not used to evaluate treatment efficacy either because of lack of tumour development (5% of the mice) or because mice are used for molecular characterization (10% of the mice).

This results in a group size of 12 animals per study arm, thus $6 \times 12 = 72$ animals per experiment

B. The animals

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

Species: Mouse (*Mus musculus*)

Age at study start: 4 weeks to 6 months

Origin: commercial breeder or institutional breeding facility

Gender: Both male or female mice can be used. Per experimental series just one gender will be selected.

Estimated numbers (see also Figure 2 of the project proposal):

12 intervention studies per year, resulting in $12 \times 72 = 864$ animals per year (4320 in 5 years).

The expected discomfort is moderate for mice in which there is no tumour engraftment (5% of the

animals, 216 per 5 year), moderate in animals which are used for molecular characterization (10% of the animals, 432 per 5 year). The remaining 3672 animals will enter the actual treatment arms of the type 2 experiments. The discomfort of these treated animals will be moderate for the ones which will be killed before the tumour has progressed to the humane endpoint (20% of type 2 experimental animals; 734 animals in 5 years); the discomfort is severe in severe in all other type 2 experimental mice (2938 animals in 5 years).

Go/No Go: If severe adverse effects of treatment are observed, the treatment will be terminated and together with the IvD we will decide if, and under which conditions, the treatment can be continued.

Justification: Mice are the most frequently used animal models in oncology research. We have broad experience with these mouse models. Much information is available with respect to available tumour models, cell lines and xenografts that are transplantable to mice. Moreover, for mice many specific research reagents are available. Many of the imaging modalities, such as preclinical MRI and BLI are specially designed for optimal use with mice.

For xenograft models we will use immunocompromised mice, for syngeneic models we will use immunocompetent mice of strains with the appropriate background. Precise strains will be communicated before start of the experiment with the IvD. This strain selection depends on the requirements of the model and the tolerance of the strain for certain therapeutic interventions.

In general, we will use mice of young age (4 - 8 weeks at start of study). However, for autopsy studies we need to order mice as soon as the paediatric patient reaches a bad condition. If the patient then recovers and the procedure is postponed, the animals can be used up to an age of 6 months.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Where applicable we will study, prior to the *in vivo* studies, cell culture experiments and other evaluations to test the proposed concepts for intervention. However, since cancer is a complex disease in which there is interaction between the tumour environment and the tumour cells, these cell cultures are not sufficient to draw conclusions about treatment efficacy. Furthermore, *in vitro* studies do not take the effects of the blood-brain-barrier into account. Therefore we need *in vivo* experiments to study the treatment of this complex disease *in vivo*.

Reduction: The number of animals per study arm is based on our experience with these models and in line with generally accepted protocols. With respect to the development of primary tumours, reduction of the number of animals reduces the chance to get a valuable model from the patient. Further reduction of the number of animals per treatment arm in intervention studies will have a severe adverse effect on the statistical power of the study.

Refinement: Unfortunately every successful induction of a brain tumour will result in severe discomfort. We try to keep this discomfort as low as possible by using appropriate analgesia and anaesthesia and strict humane endpoints.

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

To minimize animal suffering we will use appropriate analgesia and anaesthesia during and after surgical interventions and during imaging. Animals will be closely monitored during disease progression. We will adhere to the Code of Practice of handling lab animals in oncology. Adverse effects on the environment are minimal with this setup. All waste will be disposed conform legal and institutional regulations.

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.

The focus of our research group is on neuro-oncology. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings. Thus, we are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Local and/or systemic analgesia, inhalation and/or injection anaesthesia. Procedures will be communicated with and approved by the IvD before start of the experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Treatments may cause toxic side effects. Individual housing of animals could be expected in some

occasions.

Explain why these effects may emerge.

Many anticancer drugs have a broad working mechanism; quite often there is an effect on healthy cells as well. Individual housing of animals may be needed to prevent fighting (male animals) or if the mice have a cranial window or an implanted electrode or catheter.

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

Dosing will be based as much as possible on known toxicity and safety data. Nevertheless unforeseen complications may occur. In these cases we will minimize the impact of these implications as much as possible. For example by providing easy access to food and water or adaptation of the protocol (lowering dose/frequency).

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

We will use severe endpoints as described in the Code of Practise of lab animals in oncology, in line with international regulation (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102; 1555-1577).

For our models the criteria are:

Weight loss of more than 20% of the initial body weight.

A tumour mass more than 10% of the body weight (for s.c. tumours)

Severe abnormal behavior like inactivity of the animal.

Severe neurological symptoms like epileptic seizures or limping.

Indicate the likely incidence.

We expect that >85% of the mice will be included in treatment groups. All these animals will develop tumours and therefore reach humane endpoints.

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').

Disease related	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no/ week)	% of mice
Presence of tumor				
Subcutaneous (s.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	95
Progressed tumor (at humane endpoint)				
Subcutaneous (s.c.) tumor	moderate	< 2 days	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	severe	< 2 days	n.a.	68

Actions without anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Observation + Handling	mild	<2 min	7	100
Internal transport	moderate	<10 min	5	50
Solitary housing	moderate	*	n.a.	1
Quantification methods				
Caliper measurement	mild	<2 min	5	1
Weighing	mild	<2 min	7	100
Administration routes				
Subcutaneous (s.c.)	moderate	<2 min	14	99
Intraperitoneal (i.p.)	moderate	<2 min	14	50
Intramuscular (i.m.)	moderate	<2 min	14	5
Intravenous (i.v.)	moderate	<2 min	14	20
Oral gavage (p.o.)	moderate	<2 min	14	20
Blood withdrawal				
Vein cut	moderate	<2 min	**	30
Sublingual	moderate	<2 min	**	5

*Solitary housing will be avoided as much as possible, however when mice are fighting or 2 days directly after cranial window procedure this solitary housing is needed. Solitary housing may also be applicable when other mice of the cage were killed and re-arrangement of mice will affect the experiment.

**Based on maximal sampling volumes.

Actions with anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Anaesthesia	moderate	<5 min	5 ***	99
Tumor induction				
Intracranial (i.c) tumor injection	mild	<10 min	1	97
Subcutaneous (s.c.) tumor injection	mild	<2 min	1	1
Intravenous (i.v.) tumor injection	mild	<2 min	1	2
Imaging/quantification methods				
██████████	mild	<2 hours	2	10
CT-scan	mild	<2 hours	2	10
MRI-scan	mild	<2 hours	2	50
X-ray	mild	<2 hours	2	10
Fluorescence imaging	mild	<10 min	3	5
Bioluminescence imaging	mild	<10 min	3	75
Intravital microscopy	mild	<4 hours	2	5
██████████	mild	<2 hours	2	5
Blood withdrawal				
Vein cut	mild	<2 min	**	10
Sublingual	mild	<2 min	**	20
Orbital puncture	mild	<2 min	**	10
Heart puncture (endpoint)	mild	<2 min	n.a.	50
Administration routes				
Intracranial (i.c.) injection	moderate	<10 min	7	5
██████████	moderate	<1 hour	7	10
██████████	mild	<1 hour	7	20
Orbital injection	mild	<2 min	7	
Methods of killing				
Killing under anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	80
Killing without anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	20

Cumulative discomfort	% of mice
Moderate	32
Severe	68

***The maximum number of repetitions for recovery from anaesthesia is 5 times per week. On average: the anaesthesia will be provided 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To obtain tissues for analysis.

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

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

Yes



Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- | | |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer | 64156338 |
| NVWA deelnemernummer | 11400 |

2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.
- | | |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |
- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?
- | | | |
|--------------------|----------------------|---|
| Naam gemachtigde | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus | [REDACTED] | |
| Postcode en Plaats | [REDACTED] Amsterdam | |

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen. Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken? Ja > Ga door naar vraag 4 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- Een projectvergunning aanvragen
 - Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 - Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 - Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
 - Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

[Redacted]

Handtekening
gemachtigde

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11400
2. Titel van het project:
New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
3. Titel van de NTS:
Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *05-10-2016*
 - aanvraag compleet: *05-10-2016*
 - in vergadering besproken: *08-11-2016 en 13-12-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *19-12-2016*
 - advies aan CCD: *23-01-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *05-10-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *10-11-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg over het doel en waarom men bepaalde stappen zet. De navolgbaarheid en focus van het project missen, dit moet worden aangepast, het moet specifieker. Waar, wanneer en waarom doet men dingen en met welke specifieke tumoren? Er is een duidelijke onderbouwing per experiment nodig. Men moet verantwoording geven voor het aantal dieren en het ongerief bij de dieren.*
- Datum antwoord: *01-12-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 13 dec 2016.*

Vraagronde 2

- Datum: 15-12-2016
- Strekking gestelde vragen: *De DEC heeft nog een aantal tekstuele opmerkingen en de layout van de schema's kan beter. Daarnaast mist men nog de onderbouwing van de groepen tumoren en een tekstdeel over het in vitro onderzoek. Hoe selecteert men de treatments? En waar is de keuze voor de toedieningswijze van de treatments op gebaseerd? Graag ziet de DEC ook nog extra onderbouwing bij het ongerief.*
- Datum antwoord: 10-01-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Om dit doel te bereiken zal men nieuwe diermodellen met*

hersentumoren ontwikkelen en therapeutische opties testen met nieuwe en bestaande hersentumor diermodellen.

Het uiteindelijke doel van de studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren bij patiënten. Hersentumoren, met name de zeer agressieve hersentumoren, zijn zeer slecht te behandelen en een groot deel van deze patiënten overlijdt binnen enkele jaren nadat de ziekte is vastgesteld. Daarom is het van belang dat er meer kennis komt over hoe deze tumoren ontstaan en zich ontwikkelen. Daarbij is het van belang dat de diagnostiek en behandeltherapieën worden verbeterd, zodat men vroegtijdig deze tumoren kan opsporen en behandelen.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontwikkeling van therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de ingrepen die ze moeten ondergaan en het feit dat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis over (humane) hersentumoren en tegelijkertijd ontwikkelen van nieuwe diermodellen voor deze tumoren die gebruikt kunnen worden voor het onderzoek naar therapieën voor behandeling. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Ook mensen met andere tumoren kunnen mogelijk voordeel hebben bij de resultaten van dit onderzoek.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

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

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

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

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij

de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van behandelingen voor patiënten met hersentumoren. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek en het beschikbaar komen van patiëntmateriaal.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

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

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het kan zijn dat de dieren in sommige gevallen individueel worden gehuisvest. Bijvoorbeeld als er sprake is van vechtende mannetjes of na de operatie om te kunnen herstellen.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

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

De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van imaging, handelingen, bloedafname, tumorinjecties en doden onder anesthesie. Er wordt matig ongerief als gevolg van het inspuiten/inbrengen van de tumorcellen, bloedafname, anesthesie en transport. Daarnaast kunnen de dieren ook ongerief ondervinden door eventuele bijwerkingen van de therapie.

Bij 68% van de dieren zullen zich gevorderde hersentumoren ontwikkelen, wat ingeschat wordt als ernstig ongerief. Bij de overige 32% van de dieren zullen zich geen gevorderde hersentumoren ontwikkelen en wordt het cumulatieve ongerief ingeschat op matig.

Helaas is het niet mogelijk om het ernstige ongerief bij de dieren altijd te voorkomen, dit komt door de ontwikkeling van de hersentumor. De klinische signalen zijn meestal pas in een laat stadium zichtbaar, als de groeiende (hersen)tumor al vergevorderd is. Wanneer de dieren duidelijke neurologische symptomen of inactiviteit vertonen hebben ze het humane eindpunt bereikt en worden ze gedood, om meer ongerief te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan. Daarnaast zullen de dieren hersentumoren ontwikkelen, wat kan leiden tot neurologische symptomen. Tevens kunnen de dieren in sommige gevallen mogelijk negatieve bijwerkingen ondervinden van de therapie.

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

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. Hierbij zal men de Code of Practice voor kankeronderzoek gebruiken. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht (gewichtsverlies >20%) of gedrag (zoals neurologische symptomen of inactiviteit). Een groot deel van de dieren zal door de ontwikkeling van de tumor de humane eindpunten bereiken.

3V's

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

Voordat men met de dierstudies begint zullen er zoveel mogelijk metingen uitgevoerd worden met in vitro experimenten, om te testen of de nieuwe behandelingen werkzaam zijn. Echter, het is niet mogelijk om met de huidige laboratorium experimenten het effect van een nieuwe behandeling betrouwbaar vast te stellen door het complexe samenspel tussen de tumor en zijn omgeving. Omdat deze omgeving (zoals bijvoorbeeld de vorming van bloedvaten, het effect van de bloed-hersen-barrière en effecten van het immuunsysteem en de onderlinge samenhang van tumorcellen) van groot belang is, zullen de aangevraagde dierexperimenten noodzakelijk zijn. Dit onderzoek is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk zonder het gebruik van dierexperimenten.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De onderzoekers kiezen ervoor om muizen te gebruiken, omdat hiervan diermodellen beschikbaar zijn met een beperkt immuunsysteem, waarin men humane tumoren kan laten groeien. Men heeft bovendien veel ervaring met de muis als tumormodel, waardoor er methodes en apparatuur speciaal voor dit type proefdier beschikbaar is en waardoor de data goed te vergelijken is met eerdere resultaten.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Verder worden er moderne beeldvormingstechnieken gebruikt waardoor men de effecten van de behandelingen beter kan vaststellen en minder dieren nodig zijn voor effectiviteitsmetingen.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4920 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

De dieren worden gedood om de hersenen verder te kunnen analyseren.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over hersentumoren en daarmee de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren het gebruik van maximaal 4920 muizen in de dierproef die daarvan maximaal ernstig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig tot ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De

waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 4920 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van een nieuwe therapeutische behandelingen van hersentumoren is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van patiënten met hersentumoren, is afgewogen tegen het, als maximaal ernstig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 4920 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van hersentumoren.

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

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4920 muizen en het daarbij verwachte maximaal ernstige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.

Wel is er binnen de DEC lang gediscussieerd over het feit dat bij deze aanvraag een groot deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden en of dit niet voorkomen of verder verlaagd kan worden. De aard van dit onderzoek waarbij humane hersentumorcellen en de ontwikkeling daarvan bestudeerd worden in de hersenen van muizen zal leiden tot een grote kans op ernstig ongerief. Hersentumoren zullen van invloed zijn op het gedrag van de dieren en heeft neurologische symptomen tot gevolg bij de dieren. De dieren worden daarom intensief gemonitord en indien nodig uit de proef gehaald op basis van humane eindpunten.

De DEC realiseert zich de impact die dit model heeft voor de integriteit van de dieren en het resulteren daarvan in ernstig ongerief. De inschatting hiervan, door de wetenschappers, is realistisch. De DEC is van mening dat onderzoek naar de in dit project beschreven hersentumoren en de ontwikkeling van modellen van groot belang is voor het verkrijgen van meer kennis over hersentumoren en de mogelijkheid om aangrijpingspunten voor therapieën te ontdekken. Met als resultaat dat patiënten die hieraan leiden in de toekomst beter geholpen of behandeld kunnen worden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM

**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
AVD114002017841

Bijlagen

2

Datum 24 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 januari 2017. Het gaat om uw project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002017841. 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:

24 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002017841

Datum:
24 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
24 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2017
Geplande einddatum: 31 mei 2022
Titel project: New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

13 f functionaris (Proefdierdeskundige)

Plaats:

Amsterdam

Datum:

23 januari 2017

Datum:

24 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002017841



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Afdeling Crediteuren
VU Medische Centrum, [REDACTED]



**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
AVD114002017841
Bijlagen
2

Datum 24 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 januari 2017
Vervaldatum: 23 februari 2017
Factuurnummer: 170841
Ordernummer: Inkoopordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002017841	€ 1.287,00

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 17:58
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD114002017841 (met het correcte aanvraagnummer)
Bijlagen: Melding bijlage.pdf

Geachte [REDACTED]

(Excuses voor het verkeerde aanvraagnummer in de eerste mail.)

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer' met aanvraagnummer AVD114002017841. 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 schrijft in de bijlages dierproeven dat dieren van beide geslachten kunnen worden gebruikt, maar dat per experiment een geslacht wordt ingezet. Wat bedoelt u hiermee? Worden dieren van verschillende geslachten in parallel in experimenten gebruikt of kan het gebeuren dat bijvoorbeeld in de eerste 2-3 jaren dieren van een geslacht worden ingezet en daarna van het andere geslacht? Voor de volledigheid van uw aanvraag verzoeken we u dit punt te verhelderen en ook uit te leggen hoe er voor een of ander geslacht wordt gekozen.

2) U geeft aan dat dieren in groepen worden gehuisvest, maar als de dieren voor langer dan 2 dagen vechten worden deze apart gezet. Als kooigenoten worden geëuthanaseerd en het herplaatsen in een andere groep een effect zou hebben op het experiment worden de dieren ook individueel gehuisvest. Hoe vaak verwacht u dat individuele huisvesting nodig zal zijn en voor hoe lang verwacht u dat de dieren alleen in een kooi zitten? Verwacht u ook vrouwtjes individueel te huisvesten? Wat voor maatregelen worden genomen om de individuele huisvesting te voorkomen en het ongerief van langdurige individuele huisvesting te verlagen?

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. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken, verzoeken we u om uw antwoord uiterlijk **donderdag, 16 februari 2017**, naar ons toe te sturen.

Wanneer een beslissing

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

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

Aanvullende informatie AVD114002017841

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer' met aanvraagnummer AVD114002017841. 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 schrijft in de bijlages dierproeven dat dieren van beide geslachten kunnen worden gebruikt, maar dat per experiment een geslacht wordt ingezet. Wat bedoelt u hiermee? Worden dieren van verschillende geslachten in parallel in experimenten gebruikt of kan het gebeuren dat bijvoorbeeld in de eerste 2-3 jaren dieren van een geslacht worden ingezet en daarna van het andere geslacht? Voor de volledigheid van uw aanvraag verzoeken we u dit punt te verhelderen en ook uit te leggen hoe er voor een of ander geslacht wordt gekozen.

Wanneer we nieuwe cellijnen gaan gebruiken voor tumor-inductie, zullen we deze nieuwe cellijn in mannelijke en in vrouwelijke dieren injecteren. Het geslacht waarin de tumor-inductie het meest succesvol is wordt vervolgens geselecteerd voor alle toekomstige experimenten met deze cellijn. De tumor cellijnen die we nu gebruiken, zijn allen geoptimaliseerd in vrouwelijke dieren. Wanneer een nieuw experiment met deze cellijnen wordt gedaan dan wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren, dit om te voorkomen dat er extra dieren nodig zijn voor het optimaliseren van het diermodel.

2) U geeft aan dat dieren in groepen worden gehuisvest, maar als de dieren voor langer dan 2 dagen vechten worden deze apart gezet. Als kooigenoten worden geëuthanaseerd en het herplaatsen in een andere groep een effect zou hebben op het experiment worden de dieren ook individueel gehuisvest. Hoe vaak verwacht u dat individuele huisvesting nodig zal zijn en voor hoe lang verwacht u dat de dieren alleen in een kooi zitten? Verwacht u ook vrouwtjes individueel te huisvesten? Wat voor maatregelen worden genomen om de individuele huisvesting te voorkomen en het ongerief van langdurige individuele huisvesting te verlagen?

Individuele huisvesting zal slechts sporadisch voorkomen, de verwachting is in minder dan 5% van de dieren. Het kan voorkomen dat vrouwtjes individueel gehuisvest moeten worden wanneer de kooigenoten zijn geëuthanaseerd, dit zal zelden het geval zijn, en als het voorkomt dan zal dit over het algemeen aan het eind van een experiment zijn. Dientengevolge zal de individuele huisvesting in dit geval voor een periode van maximaal 3 weken zijn. Individuele huisvesting wordt voorkomen door: Dieren zo jong mogelijk groepsgewijs te huisvesten (zodat ze minder gaan vechten), en dieren indien mogelijk over te plaatsen naar een andere kooi wanneer er individuele huisvesting dreigt.

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. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken, verzoeken we u om uw antwoord uiterlijk **donderdag, 16 februari 2017**, naar ons toe te sturen.

Wanneer een beslissing

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**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
AVD114002017841
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" met aanvraagnummer AVD114002017841. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot het geslacht van de dieren en de huisvesting beantwoord.

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 "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

In dit project is er sprake van ongeriefcategorie Ernstig.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 23 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:
AVD114002017841

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.

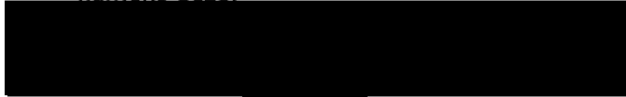
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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 Peute
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Adres: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022, voor het project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" met aanvraagnummer AVD114002017841, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. 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 23 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 januari 2017, ontvangen op 23 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Protocol for brain tumour transplantation				
	Muizen (Mus musculus) / immuunincompetent	600	66% Ernstig 34% Matig	
3.4.4.2 Protocol for treatment of brain tumours.				
	Muizen (Mus musculus) / immuunincompetent	4.320	68% Ernstig 32% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2023

Aanvraagnummer:

AVD114002017841

plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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:
AVD114002017841

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:
AVD114002017841

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.